

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

Modulación mediante preconditionamiento isquémico de la expresión de MCP1 y citoquinas proinflamatorias en un modelo experimental de isquemia-reperfusión pulmonar

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Leire Azcárate Perea

Directores

**Carlos Simón Adiego
Federico González Aragonese
Elena Vara Ameigeira**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

Modulación mediante preconditionamiento
isquémico de la expresión de MCP1 y citoquinas
proinflamatorias en un modelo experimental de
isquemia-reperfusión pulmonar

AUTOR: LEIRE AZCÁRATE PEREA

DIRECTORES: Dr. Carlos Simón Adiego

Dr. Federico González Aragonese

Dra. Elena Vara Ameigeira

MADRID, OCTUBRE 2015

Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	LEIRE AZCÁRATE PEREA
Título de la Tesis	Modulación mediante preconditionamiento isquémico de la expresión de MCP1 y citoquinas proinflamatorias en un modelo experimental de isquemia-reperfusión pulmonar.
Facultad o Centro	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	CARLOS SIMÓN ADIEGO
Centro al que pertenece y dirección	FEA Cirugía Torácica. HGU Gregorio Marañón Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad Complutense de Madrid
D.N.I./Pasaporte	513742328X
e-mail	carlosmsa@telefonica.net

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

La doctoranda Dña. Leire Azcárate Perea ha participado activamente como investigador en el proyecto de investigación del que es fruto esta tesis doctoral, cuyos principales resultados han sido publicados en la revista European Journal of Cardiothoracic Surgery, indexada en el Journal of Citation Repots.

Durante más de cinco años ha colaborado en los proyectos de investigación de nuestro equipo, desarrollando actividades experimentales, estudio y documentación, análisis de resultados y redacción de comunicaciones y publicaciones que le capacitan para optar al Grado Académico de Doctor.

Durante más de cuatro años ha enfocado su actividad investigadora al proyecto específico que presenta en esta tesis, "Modulación mediante preconditionamiento isquémico de la expresión de MCP1 y citoquinas proinflamatorias en un modelo experimental de isquemia-reperfusión pulmonar.", en la que se incorporan estudios posteriores a los publicados y que hacen más completo e interesante el trabajo. Por todo ello esta Tesis reúne todas las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor y ser expuesto y discutido ante el tribunal correspondiente.

Madrid, a 11 de octubre de 2015

Fdo.: Carlos María Simón Adiego

Este impreso deberá entregarse al

Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.

Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	LEIRE AZCÁRATE PEREA
Título de la Tesis	Modulación mediante preconditionamiento isquémico de la expresión de MCP1 y citoquinas proinflamatorias en un modelo experimental de isquemia-reperfusión pulmonar.
Facultad o Centro	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

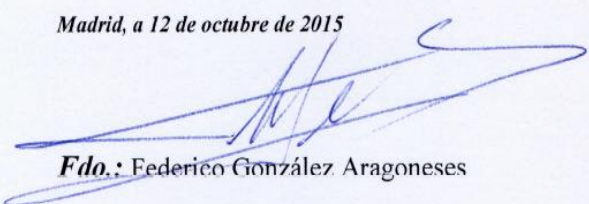
DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	FEDERICO GONZÁLEZ ARAGONESES
Centro al que pertenece y dirección	Jefe de Servicio de Cirugía Torácica. HGU Gregorio Marañón. Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad Complutense de Madrid
D.N.I./Pasaporte	01379244^a
e-mail	fgaragoneses@hotmail.com

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo realizado por Dña. Leire Azcárate Perea, con el título “Modulación mediante preconditionamiento isquémico de la expresión de MCP1 y citoquinas proinflamatorias en un modelo experimental de isquemia-reperfusión pulmonar”, reúne satisfactoriamente las características necesarias de originalidad, planteamiento de la hipótesis de trabajo, desarrollo metodológico y discusión crítica de los resultados para optar al Grado Académico de Doctor, y considero que dicho trabajo puede ser expuesto y discutido por el doctorando ante el tribunal correspondiente.

Madrid, a 12 de octubre de 2015



Fdo.: Federico González Aragonese

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	LEIRE AZCÁRATE PEREA
Título de la Tesis	Modulación mediante preconditionamiento isquémico de la expresión de MCP1 y citoquinas proinflamatorias en un modelo experimental de isquemia-reperfusión pulmonar.
Facultad o Centro	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	ELENA VARA AMEIGEIRAS
Centro al que pertenece y dirección	Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la UCM
D.N.I./Pasaporte	33202901D
e-mail	evaraami@ucm.es

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

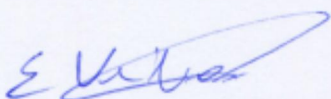
INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

La Dña. Leire Azcárate Perea ha realizado, bajo mi dirección y de los Dres. Carlos M Simón Adiego y Federico González Aragonese, el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada "Modulación mediante preconditionamiento isquémico de la expresión de MCP1 y citoquinas proinflamatorias en un modelo experimental de isquemia-reperfusión pulmonar.". La doctoranda ha participado activamente con nosotros como investigadora en diferentes proyectos de investigación subvencionados (PI07/0840, SEPAR 2006/121) enfocados en la posible modulación de la respuesta inflamatoria secundaria a la isquemia reperfundición pulmonar. Su participación en estos proyectos le ha permitido realizar una serie de actividades experimentales, conducentes a la obtención del Grado Académico de Doctor. En este período ha obtenido una serie de logros y resultados que se han materializado hasta la fecha en su participación como coautor en publicaciones en revistas indexadas en el Journal of Citation Reports.

También ha participado en diversos congresos científicos tanto nacionales como internacionales, donde se han presentado los resultados de su estudio.

Además de lo expuesto en cuanto a la capacidad investigadora de la doctorando, considero que el trabajo realizado reúne las características necesarias de originalidad, planteamiento adecuado de la hipótesis de trabajo, desarrollo metodológico adecuado y discusión crítica de los resultados para ser defendida como tesis doctoral.

Madrid, a 12 de octubre de 2015



Fdo.: Elena Vara Ameigeiras

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento,

Al Dr Carlos Simón Adiego, Médico Adjunto de Cirugía Torácica del Hospital Gregorio Marañón, por su incansable afán de trabajo y perfeccionismo, por ofrecerme la gran oportunidad de desarrollar este proyecto, y por su paciencia y motivación en mis momentos de flaqueza. Sin él, no hubiera sido posible este trabajo.

A la Dra Elena Vara Ameigeiras, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por introducirme en el mundo de la Bioquímica, hasta ahora desconocida para mí y por estar siempre dispuesta a resolver mis dudas.

Al Dr Federico Gonzalez Aragonese, Jefe de Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Gregorio Marañón, por su vocación docente e investigadora, que me han animado a comenzar con este proyecto.

A los residentes de Anestesiología, de Cirugía Torácica, estudiantes de Medicina y miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Complutense, por su esfuerzo y sacrificio, y por tantas horas pasadas juntos durante la elaboración de este experimento.

A Luis Huerta Martínez, Médico Adjunto de Cirugía Torácica del Hospital Gregorio Marañón, que me ayudado con los trámites de matrícula e impresión de este trabajo, que tan difíciles resultan desde la distancia.

A mis padres, que desde el momento que decidí estudiar Medicina, no dudaron ni un minuto en apoyarme y animarme a seguir adelante. Cada uno de mis logros, se lo debo a ellos.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP: Adenosín monofosfato

ATP: Adenosín trifosfato

cADN: ADN complementario

DNA: Dinucleótido adenosín

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas

eNOS: Óxido nítrico sintetasa endotelial

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FC: Frecuencia cardiaca

Fig: Figura

Grupo PI: Grupo preconditionamiento isquémico

IC: Índice cardiaco

IFN- γ : Interferón gamma

IKB: Inhibidor del factor de transcripción kappa b

IKB-P: Inhibidor del factor de transcripción kappa b fosforilado

IKK: IKB kinasa

IL 1: Interleuquina 1

IL 10: Interleuquina 10

IL 1- β : Interleuquina 1 beta

IS: Índice sistólico

LPD: Low potassium dextran

Lpm: Latidos por minuto

LPO: Lipoperóxidos

mARN: ARN mensajero

MCDP: 10-N-metilcarbamoil-3-7-dimetilamino-10-10-fenotiacina

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1

MDA: Malonilaldehído

MPO: Mieloperoxidasa

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido hidrosulfato

NFkB: Factor de transcripción tisular b

NK: Natural killer

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintetasa

PaCO₂: Presión arterial de dióxido de carbono

PAD: Presión arterial diastólica

PAM: Presión arterial media

PaO₂: Presión arterial de oxígeno

PAPM: Presión media de la arteria pulmonar

PAS: Presión arterial sistólica

PCP: Presión capilar pulmonar

PEEP: Presión positive expiratoria

PGE₁: Prostaglandina 1

PI: Precondicionamiento isquémico

PMN: Polimorfonucleares neutrófilos

Post-R 10': 10 minutos de reperfusión

Post-R 30': 30 minutos de reperfusión

PPD: Presión pulmonar diastólica

PPM: Presión pulmonar media

PPS: Presión pulmonar sistólica

Pre-N: Pre-neumonectomía

Pre-R: Pre-reperfusión

PVC: Presión venosa central

RLO: Radicales libres de oxígeno

RNA: Ribonucleótido adenosín

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

SIR: Síndrome de isquemia reperfusión

SPV: vena pulmonar craneal

SVC: Vena cava superior

SVO2: Saturación venosa de oxígeno

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

T-TBS: amortiguador salino de tris + Tween 20

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

VS: Volumen sistólico

VT: Volumen tidal

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	29
1.1. Síndrome de isquemia reperusión	31
1.2. Síndrome de isquemia reperusión pulmonar	33
1.2.1 Estrés Oxidativo	35
1.2.2 Mediadores Celulares	39
1.2.2.1 Macrófagos	40
1.2.2.2 Linfocitos	40
1.2.2.3 Neutrófilos	40
1.2.2.4 Células epiteliales alveolares	41
1.2.2.5 Células endoteliales	41
1.2.3 Mediadores Inflamatorios	42
1.2.3.1 Citoquinas/Quimioquinas	42
1.2.3.1.1 Interleuquina 1	43
1.2.3.1.2 Factor de Necrosis Tumoral α	43
1.2.3.1.3 Interleuquina 10	43
1.2.3.1.4 Proteína Quimiotáctica de los Monocitos 1	44
1.2.3.2 Moléculas de Adhesión	50
1.2.3.3 Sistema del Complemento	50
1.2.3.4 Factores de Transcripción	51
1.3 Estrategias Terapéuticas	51

1.3.1	Soluciones de preservación pulmonar	51
1.3.2	Temperatura y ventilación	52
1.3.3	Óxido Nítrico	53
1.3.4	Prostaglandinas	54
1.3.5	Surfactante	55
1.3.6	Precondicionamiento	55
1.3.7	Otras estrategias	56
1.4	Precondicionamiento Isquémico	56
1.5	Modelos Experimentales de Precondicionamiento Isquémico	62
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
2.1	Hipótesis	67
2.2	Objetivos	68
3	MATERIAL Y MÉTODOS	71
3.1	Material	73
3.1.1	Material Biológicos: animales	73
3.1.2	Quirófano e instalaciones	74
3.1.3	Aparataje	76
3.2	Métodos	79
3.2.1	Monitorización y técnica anestésica	81
3.2.2	Procedimiento quirúrgico	83
3.2.3	Diseño experimental	86

3.2.4	Mediciones y recogida de muestras	86
3.2.4.1	Variables Hemodinámicas	87
3.2.4.2	Variables Gasométricas	88
3.2.4.3	Variables Bioquímicas del Tejido Pulmonar	88
3.2.4.4	Estudio histológico del tejido pulmonar	94
3.2.5	Análisis estadístico	96
4	RESULTADOS	97
4.1	Datos Demográficos y tiempos quirúrgicos	99
4.2	Resultados Hemodinámicas	99
4.3	Resultados Gasométricos	105
4.4	Variables Bioquímicas	107
4.4.1	Estrés Oxidativo	108
4.4.2	Mediadores inflamatorios: citoquinas y quimioquinas	110
4.4.3	Factores de transcripción	118
4.5	Resultado histológico del tejido pulmonar	124
5	DISCUSIÓN	127
5.1	Efectos del PI sobre las variables hemodinámicas	132
5.2	Efectos del PI sobre las variables gasométricas	133
5.3	Efectos del PI sobre el estrés oxidativo y activación leucocitaria	135
5.4	Efectos del PI sobre mediadores inflamatorios	137

5.4.1	Citoquinas	137
5.4.2	Quimioquina MCP-1	140
5.4.3	Factores de transcripción	143
5.5	Efectos del PI sobre el tejido pulmonar	146
6	CONCLUSIONES	149
7	BIBLIOGRAFÍA	153
8	ANEXO	175

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Privar de flujo sanguíneo a un órgano (isquemia) y luego restablecerlo (reperfusión) causa un daño que se denomina lesión por isquemia reperfusión (LIR). Las lesiones producidas durante la fase de isquemia se relacionan sobretudo con la privación de oxígeno que reduce los fenómenos respiratorios celulares y puede llegar a causar, en pocos minutos, lesiones irreversibles en órganos vitales tales como el corazón, cerebro, pulmón o hígado. La reperfusión supone después el paso al torrente sanguíneo de productos tóxicos desde el tejido isquémico y la multiplicación de mediadores inflamatorios. Todo ello genera una respuesta inflamatoria que no solo daña el órgano sometido a isquemia (respuesta local), sino también órganos distantes (respuesta sistémica).

En el caso de la cirugía pulmonar, cada vez son más y de mayor complejidad los procedimientos quirúrgicos, que a menudo producirán fenómenos de isquemia por un determinado periodo de tiempo. En este caso, la isquemia se caracteriza por ausencia de flujo sanguíneo en el pulmón, formándose así, radicales libres de oxígeno, citoquinas y proteasas que supondrán un reclutamiento de neutrófilos y linfocitos manifestándose finalmente en daño alveolar difuso, edema intersticial, aumento de las resistencias vasculares, disminución de la complianza e hipoxia.

A pesar de que se conoce la existencia de la lesión por isquemia reperfusión desde hace más de cuarenta años, su fisiopatología es compleja, y a pesar de los esfuerzos para reducir su impacto, los logros obtenidos han sido más bien escasos.

Se han aplicado diversas estrategias terapéuticas, unas basadas en la administración de fármacos (corticoides, antioxidantes, anticuerpos anticitocinas...), otras en la aplicación de terapia génica, perfusión con soluciones de preservación, diferentes técnicas de ventilación y quirúrgicas, y finalmente, otras basadas en el llamado shock térmico.

De todas ellas, la que ha demostrado tener unos efectos más beneficiosos y una mayor utilidad clínica es la estrategia quirúrgica del preconditionamiento isquémico (PI). Fue un fenómeno descrito por primera vez en el corazón por Murry et al en 1986. Consiste en la aplicación de episodios de isquemia-reperfusión breves repetitivos, antes de una isquemia-reperfusión prolongada. Posteriormente se demostró que la protección obtenida del PI podía ser aplicable a otros órganos con funcionalidad diversa siendo su tolerancia a la LIR y tiempo necesario de PI diferente para cada caso. No obstante, aun sigue siendo motivo de investigación sus mecanismos y modulación, en especial en el pulmón, donde hasta la fecha existen escasos artículos publicados.

Estudios previos han reflejado que los macrófagos alveolares contribuyen a la fase aguda de la LIR. En respuesta a un estrés oxidativo, los macrófagos alveolares producirán diversas citoquinas y proteínquinasas. La proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), es una proteínquinasa que regula la migración y activación de monocitos y macrófagos, y que se cree que juega un papel crucial en el proceso de la LIR.

Su expresión será regulada por el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleukina 1 (IL 1) e interleukina 10 (IL 10) que se activan bajo situaciones de hipoxemia y exceso de radicales libres de oxígeno (RLO). Aunque se ha visto que el PI inhibe

la producción de RLO, TNF- α e IL-1, hasta la fecha existen escasos estudios que relacionen la modulación de la MCP-1 con el PI.

Tras la activación de proteínquinasas, se pueden inducir otros factores de transcripción, como el factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB) y su inhibidor (IkB). Su modulación jugará un papel importante en la atenuación de citoquinas proinflamatorias y en el efecto protector atribuible al PI.

La mayoría de los estudios para preservar el tejido pulmonar de los efectos de la LIR se realizan en modelos experimentales o clínicos de trasplante pulmonar con isquemia fría. Sin embargo, existen situaciones clínicas en las que no es posible el enfriamiento progresivo del pulmón, ni su perfusión con solución de preservación, como son las resecciones pulmonares con angioplastia o trasplantes de lóbulo pulmonar en donante vivo, donde el tejido pulmonar sufrirá un periodo más o menos largo de isquemia normotérmica, siendo frecuentes después, el edema pulmonar y la ventilación postoperatoria prolongada. Un modelo experimental que reproduce esta situación es el autotrasplante pulmonar en animales.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es estudiar el posible efecto modulador del preconditionamiento isquémico pulmonar sobre la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y sobre la expresión de mediadores inflamatorios implicados en su regulación, en un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el siguiente estudio, se realiza un procedimiento de autotrasplante pulmonar ortotópico (neumonectomía izquierda, lobectomía craneal exsitu, y reimplante del lóbulo caudal izquierdo) en 14 cerdos de la raza large-white, con un periodo de perfusión post-implante de 30 minutos.

Los animales son divididos aleatoriamente en dos grupos: Grupo control (n=7) con autotrasplante sin PI, y Grupo autotrasplante con PI (n=7).

Son tomadas medidas hemodinámicas y gasométricas basales tras 30 minutos de haber sido realizada la toracotomía. A continuación, el protocolo de recogida de datos hemodinámicos, gasométricos y de tejido pulmonar es en los siguientes cuatro momentos: Pre-neumonectomía (PreN), Pre-perfusión (PreR), 10 minutos (Rep-10) y 30 minutos (Rep-30) tras la perfusión.

Medidas hemodinámicas: Frecuencia cardiaca monitorizada por ECG. Presión arterial media mediante catéter arterial femoral. El catéter de arteria pulmonar permite medir la presión de arteria pulmonar media, presión capilar pulmonar, presión venosa central, índice cardiaco y volumen sistólico.

Medidas gasométricas: Medidas de sangre arterial sistémica en los momentos mencionados. Además se extrae sangre de la vena pulmonar mediante punción directa, en los 10 y 30 minutos post-perfusión.

Medidas bioquímicas en tejido pulmonar: Las dos primeras biopsias (Pre-N y Pre-R) son obtenidas del lóbulo craneal y las dos últimas (Rep-10 y Rep-30) del lóbulo caudal ya implantado. Se toman medidas de estrés oxidativo y activación leucocitaria a partir de Lipoperoxidasa (LPO), malondialdehído (MDA) y mieloperoxidasa (MPO). Estudio de mediadores inflamatorios: MCP-1 (ELISA y

mRNA), IL1, TNF- α (western blot y mRNA), IL-10 (mRNA) y NFkB, I κ B e I κ B-P (western Blot).

Medidas anatomopatológicas del tejido pulmonar: Estas muestras se toman en los mismos momentos que las muestras bioquímicas del tejido pulmonar, y a partir del lóbulo craneal en Pre-N y Pre-R y del lóbulo caudal en Post-R10' y Post-R 30'. Se analizarán mediante microscopía óptica la infiltración de monocito-macrófago, la infiltración de neutrófilos y el edema en intersticio tisular.

RESULTADOS

Los resultados en nuestro experimento demostraron que:

- Los valores hemodinámicos se mostraron estables durante todo el estudio.
- La PaO₂ tomada a través de vena pulmonar inferior fue destacadamente mejor en el grupo PI a partir del minuto 30 de la reperfusión.
- En cuanto al estrés oxidativo, se demuestra una reducción de niveles de lipoperóxidos y mieloperoxidasa a partir de la reperfusión en el grupo PI.
- La expresión proteica de IL 1 y TNF α y de su mRNA fue aumentando progresivamente tras la isquemia-reperfusión. En cambio, en el grupo PI se demuestra su supresión a niveles marcadamente menores.
- El PI redujo significativamente la expresión de la proteína MCP1 y de su mRNA desde el momento previo a la reperfusión.
- Finalmente, tras la isquemia-reperfusión, existe un aumento de expresión del subtipo nuclear (forma activada) de NFkB p50 y NFkB p65. En el grupo PI se demostraron expresiones menores del subtipo nuclear NFkB p50

desde el momento previo a la reperfusión, y del subtipo nuclear NFkB p65 en el minuto 30 de la reperfusión.

CONCLUSIONES

En nuestro estudio la isquemia reperfusión pulmonar produjo una respuesta inflamatoria aumentando el estrés oxidativo, y la expresión de citoquinas y MCP1 de forma progresiva. También se observó la relación entre las subformas de NFkB p50 y p65 activadas en el núcleo y su incremento ante este estímulo.

La mejora en la oxigenación de la sangre venosa, modulación del estrés oxidativo, y reducción de expresión de MCP1, NFkB p50 y p65 y otras citoquinas tras la aplicación del preconditionamiento isquémico, sugieren que esta técnica puede tener un papel beneficioso en el control del daño pulmonar tras la isquemia reperfusión.

ABSTRACT

INTRODUCTION

To deprive blood flow to an organ (ischemia) and then reset (reperfusion) causes damage called ischemia reperfusion (LIR). The injuries during the ischemia are related mainly to oxygen deprivation that reduces cellular respiratory phenomena and may even cause, in minutes, irreversible damage to vital organs such as the heart, brain, lung or liver. Reperfusion following step involves the bloodstream of toxic products from the ischemic tissue and multiplication of inflammatory mediators. All this generates an inflammatory response that not only damages the organ subjected to ischemia (local response), but also distant organs (systemic response).

In the case of lung surgery, they are becoming more and more complex surgical procedures, where often occur phenomena of ischemia for a specified period of time. In this case, ischemia is characterized by the absence of blood flow in the lung, thus forming, free oxygen radicals, cytokines and proteases which will involve recruitment of neutrophils and lymphocytes eventually manifesting in diffuse alveolar damage, interstitial edema, increased resistance vascular, decreased compliance and hypoxia. Although it is known the existence of ischemia reperfusion for over forty years ago, its physiology is complex, and despite efforts to reduce its impact, the achievements have been rather limited.

Have been applied several therapeutic strategies based on the administration of drugs (steroids, antioxidants, cytokine antibodies ...), others in applying gene therapy, perfusion preservation solutions, various ventilation and surgical techniques, and finally, others based the so-called thermal shock.

Of these, which has shown to have more benefits and greater clinical utility is the surgical strategy of ischemic preconditioning (IP). It was a phenomenon first described in the heart by Murry et al in 1986. It involves the application of episodes of repetitive ischemia-reperfusion before prolonged ischemia-reperfusion. Later it was shown that the protection obtained from PI could be applicable to other organs being its tolerance and time for LIR different for each IP. However, its modulation mechanisms, is still a matter of research, especially in the lung, where so far there are few published articles.

Previous studies have reflected that alveolar macrophages contribute to the acute phase of LIR. In response to an oxidative stress, alveolar macrophages produce various cytokines and protein kinases. Monocyte chemotactic protein (MCP-1) is a protein kinase that regulates the migration and activation of monocytes and macrophages, and is believed to play a crucial role in the process of the LIR. His expression will be regulated by the tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 1 (IL 1) and interleukin 10 (IL 10) that are activated under conditions of hypoxia and excess of oxygen free radicals (ROS). Although it has been seen that the PI inhibits the production of ROS, TNF- α and IL-1, to date there are few studies that relate the modulation of MCP-1 in the IP. After activation of protein kinases, these ones can induce other transcription factors such as nuclear factor kappa B (NFkB) and its inhibitor (I κ B). Its modulation will play an important role in attenuating proinflammatory cytokines and the protective effect attributable to the IP.

Most studies to preserve lung tissue from the effects of LIR have been performed in experimental models or clinical lung transplantation with cold ischemia. However, there are clinical situations where it is not possible the progressive cooling of the lung, or the perfusion preservation solution, such as lung resections

with angioplasty or lung lobe transplants from living donors, where lung tissue suffers a period of normothermic ischemia, with frequent later, pulmonary edema and prolonged postoperative ventilation. An experimental model that reproduces this situation is the autologous lung transplant in animals.

OBJECTIVE

The objective of this study was to study the possible modulator effect of pulmonary ischemic preconditioning on the expression of monocyte chemotactic protein (MCP-1) and on the expression of inflammatory mediators involved in their regulation, in an experimental lung transplant model in pigs.

MATERIAL AND METHODS

In the following study, it is performed an autologous orthotopic lung transplant(left pneumonectomy, cranial lobectomy exsitu, and reimplantation of left caudal lobe) in 14 pigs of the Large White race, with a period of post-implant 30 minute reperfusion.

The animals are randomly divided into two groups: control group (n = 7) without PI and a PI group (n = 7).

Hemodynamic measurements and baseline blood gas are taken after 30 minutes of being made thoracotomy. Then the collection protocol of hemodynamic, blood gas and lung tissue data is in the following four stages: Pre-pneumectomy (PreN), Pre-reperfusion (PreR), 10 minutes (Rep-10) and 30 minutes (Repsol 30) after reperfusion.

Hemodynamic measures: heart rate is monitored by ECG. Mean arterial pressure by femoral arterial catheter. The pulmonary artery catheter for measuring the mean

pulmonary artery pressure, pulmonary capillary wedge pressure, central venous pressure, cardiac index and stroke volume.

Gasometric measures: measures of systemic arterial blood in the above times. Furthermore pulmonary vein blood is drawn by direct puncture, in the 10 and 30 post-reperfusion minutes.

Biochemical measurements in lung tissue: The first two biopsies (Pre-N and Pre-R) are obtained from the cranial lobe and the last two (Rep-10 and Rep-30) and implanted caudal lobe. Measures of oxidative stress and leukocyte activation from Lipoperoxidasa (LPO), malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) are made. Study of inflammatory mediators: MCP-1 (mRNA and ELISA), IL 1, TNF- α (western blot and mRNA), IL-10 (western blot and mRNA) and NFkB, I κ B and I κ B-P (Western blot).

Pathological measures of lung tissue: These samples are taken at the same times that biochemical samples of lung tissue, and from the cranial lobe in Pre-N and Pre-R and caudal lobe in Post-R10 'and Post-R 30'. By optical microscopy are analyzed: monocyte-macrophage infiltration, neutrophil infiltration and edema in tissue interstitium.

RESULTS

In our experiment results showed that:

- The hemodynamic values were stable throughout the study.
- The PaO₂ taken through inferior pulmonary vein was remarkably better in the PI group after 30 minutes of reperfusion.

- As oxidative stress, reduced levels of lipid peroxides and myeloperoxidase are demonstrated from reperfusion in the PI group.
- The protein expression of IL 1 and TNF and its mRNA was gradually increased after ischemia-reperfusion. In contrast, in the PI group deletion is shown to markedly lower levels.
- PI significantly reduced the expression of MCP1 protein and its mRNA from the time prior to reperfusion.
- Finally, after ischemia-reperfusion, there is an increased expression of nuclear subtype (activated form) p50 NFkB and p65 NFkB. In the PI group, lower expressions of p50 NFkB nuclear subtype is demonstrated from the previous time to reperfusion, and of p65 NFkB nuclear subtype from 30 minutes of reperfusion.

CONCLUSION

In our study the pulmonary ischemia reperfusion produces an inflammatory response by increasing oxidative stress and expression of cytokines and MCP1 progressively. The relationship between the activated subforms of p50 NFkB and p65 NFkB and its increase to this stimulus was also observed. The improvement in oxygenation of venous blood, modulation of oxidative stress, and reduced expression of MCP-1, NFkB p50 and p65 and other cytokines following application of ischemic preconditioning, suggest that this technique may have a beneficial role in controlling the lung damage after ischemia reperfusion.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 SÍNDROME DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN

Privar de flujo sanguíneo a un órgano (isquemia) y luego restablecerlo (reperfusión) causa un daño que se denomina lesión por isquemia reperfusión.

El síndrome de isquemia reperfusión (SIR) es el resultado de la abolición y posterior restauración del flujo sanguíneo a un órgano.

Como consecuencia de la isquemia y reperfusión de un órgano o tejido, se desarrollará una serie de lesiones de las que va a depender la posterior viabilidad funcional del órgano o tejido y la activación de mediadores moleculares y celulares que desencadenarán diversas respuestas sistémicas.

Las lesiones producidas durante la fase de isquemia se relacionan sobretodo con la privación de oxígeno, que reduce los fenómenos respiratorios celulares y convierte el metabolismo aerobio en anaerobio. Con la hipoxia, aumenta el ácido láctico con la consiguiente acidosis metabólica. Esto alterará posteriormente el gradiente transmembrana, con un aumento del calcio intracelular y la activación de numerosos sistemas enzimáticos implicados en la respuesta inflamatoria. Todo ello, asociado a la producción de radicales libres por la activación del sistema xantina oxidasa, puede llegar a causar, en pocos minutos, lesiones irreversibles en órganos vitales como el corazón, cerebro, pulmón o hígado (1).

La reperfusión, con la nueva entrada de sangre y oxígeno, conlleva el paso al torrente sanguíneo de productos tóxicos desde el tejido isquémico y la multiplicación de mediadores inflamatorios a través de la su reacción con el

oxígeno libre. La fase de reperfusión se ha relacionado con la mayor parte de lesiones que ocurren en el SIR.

En resumen, la isquemia conduce a un estado proinflamatorio que aumenta la vulnerabilidad del tejido durante la reperfusión y puede llevar a la necrosis celular o apoptosis.

Todo ello genera una respuesta inflamatoria que no solo daña el órgano sometido a la isquemia (respuesta local), sino también órganos distantes (respuesta sistémica) debido al desarrollo de acidosis láctica hiperkaliémica, destrucción muscular con mioglobinemia y mioglobinuria, y finalmente fracaso multiorgánico como la máxima expresión de una respuesta inflamatoria desmesurada por el daño isquemia reperfusión (2).

Aunque se conoce la existencia de lesión por isquemia reperfusión hace más de cuarenta años, su fisiopatología es compleja, y a pesar de los reiterados esfuerzos para reducir su impacto, los logros obtenidos han sido más bien escasos.

El conocimiento de los fenómenos de isquemia reperfusión es de gran interés ya que en la práctica clínica existen numerosas situaciones en las que se puede desarrollar, como en los trasplantes de órganos, cirugías reconstructivas con isquemia prolongada, situaciones de bajo gasto cardíaco y *shock*, embolias, infartos cerebrovasculares o en síndromes de aplastamiento.

1.2 SÍNDROME DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN PULMONAR

Desde el primer intento de trasplante pulmonar en 1963, avances quirúrgicos y científicos han proporcionado una mejora en la calidad de vida de los transplantados. Se ha convertido en la opción para muchos pacientes en estados finales de ciertas enfermedades pulmonares como la fibrosis quística, bronquiectasias, hipertensión pulmonar primaria, fibrosis pulmonar idiopática o enfisema pulmonar.

En la última década se ha apreciado un aumento significativo en el número de centros que realizan trasplante pulmonar y en el número de receptores de pulmón.

El síndrome de isquemia reperfusión supone un importante obstáculo en la óptima evolución de estos pacientes ya que sigue siendo la primera causa de fallo primario del injerto pulmonar, provocando un aumento del riesgo de rechazo agudo y, a largo plazo, de rechazo crónico por bronquiolitis obliterante. Además de esto, será la segunda causa más importante implicada en la pérdida del órgano transplantado tras el rechazo inmunológico (3).

El síndrome de isquemia reperfusión repercute significativamente en la morbilidad temprana del trasplante pulmonar, que ocurrirá en las primeras 72 horas. Se caracteriza por un daño alveolar inespecífico, edema pulmonar e hipoxemia en grado variable. Clínica y radiológicamente, se determina por la aparición de infiltrados pulmonares e hipoxemia que requerirán tratamiento con presión ventilatoria positiva, terapia farmacológica y, ocasionalmente, oxigenación por membrana extracorpórea (4).

Diversos estudios clínicos han demostrado la asociación del trasplante con una morbilidad hospitalaria aumentada, resultando además, en una ventilación prolongada, hipertensión pulmonar postoperatoria y una mayor estancia en unidad de cuidados intensivos.

Se considera que la incidencia estimada de síndrome de isquemia reperusión tras el trasplante pulmonar es del 41%, con una mortalidad a los 30 días de un 40%, frente a tan solo un 7% en los pacientes que no hayan manifestado este síndrome (5).

Por otro lado, actualmente, cada vez son más y más complejos los procedimientos quirúrgicos que los cirujanos torácicos realizan de forma habitual. Las diferentes situaciones clínicas que nos presentan los pacientes en ocasiones implican una isquemia pulmonar durante un determinado periodo de tiempo, como es el caso de la angioplastia de la arteria pulmonar, la resección exsitu de tumores pulmonares, la trombolisis después de un embolismo pulmonar masivo o el by-pass cardiopulmonar durante la circulación extracorpórea (6;7).

Por todo ello, una detallada definición de todos los mecanismos inflamatorios e inmunológicos, que forman parte en la patogénesis multifactorial de este síndrome, nos llevará a un mejor entendimiento del mismo y será de gran utilidad para conocer las diferentes estrategias encaminadas a controlarlo.

1.2.1 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo se caracteriza por la formación de reactivos de oxígeno como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxil (OH). Estas moléculas son altamente inestables, y reaccionan con la primera estructura que encuentran, frecuentemente los lípidos de membrana. El daño celular resultante de la peroxidación lipídica puede ir desde el aumento de permeabilidad a la lisis celular (5;8).

Dos mecanismos importantes son los responsables de la producción de estos reactivos de oxígeno (figura 1):

- Sistema xantino-oxidasa: corresponde a la degradación de hipoxantina en superóxido (O_2^-) mediante la conversión de xantino dehidrogenasa a xantino oxidasa durante la reoxigenación(8).
- Vía de la NADPH: Depende del sistema Nicotinamida adenosin dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), que aparece principalmente en la superficie de los macrófagos y neutrófilos y cataliza la reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido (O_2^-)(8).

El síndrome de isquemia reperusión corresponde a anoxia-reoxigenación en el órgano transplantado, no obstante, en el pulmón debe considerarse que el oxígeno permanece en los alveolos durante la preservación isquémica por lo que se mantiene un metabolismo aerobio previniendo la hipoxia.

Por lo tanto, cabe destacar la diferencia entre estrés oxidativo por hipoxia, y el “no hipóxico” o por isquemia que tiene lugar en el pulmón (8).

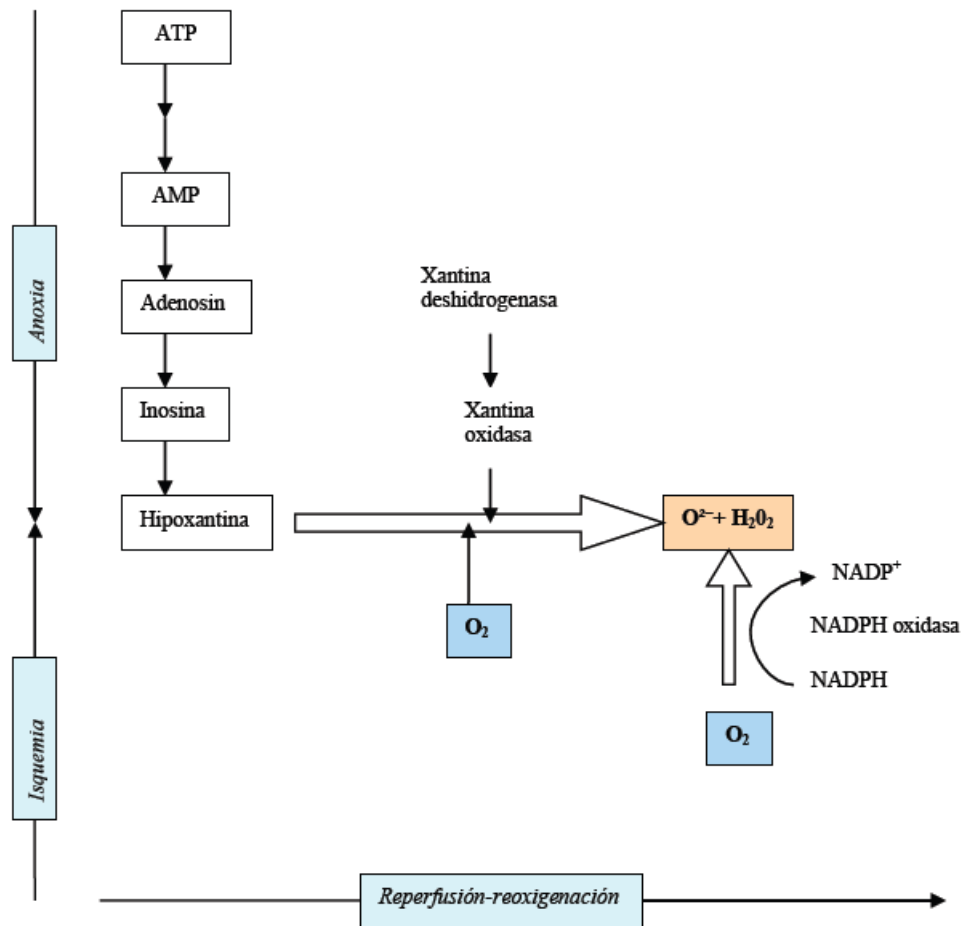


Fig1. Diferentes vías de formación de reactivos de oxígeno durante la isquemia.reperfusión y la anoxia-reperfusión.

ATP: Adenosin Trifosfato; AMP: Adenosin Monofosfato; NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

En la anoxia-reoxigenación, se producirá un descenso marcado de Adenosin Trifosfato (ATP) y aumento de sus productos de degradación como es la hipoxantina, la cual, mediante la reacción con la xantino oxidasa, generará superóxido en el momento que el oxígeno sea reintroducido en la reperfusión.

En cambio, en el pulmón, la isquemia se caracteriza por ausencia de flujo sanguíneo, que produce estrés oxidativo y peroxidación lipídica por otros mecanismos, a pesar de la presencia de oxígeno.

El endotelio parece ser uno de los orígenes principales de esta respuesta “no hipóxica”. Esto se debe a que es altamente sensible a los cambios en las fuerzas del flujo sanguíneo y transformará estas variaciones, en señales eléctricas y bioquímicas. Se estimulará de este modo, la depolarización de membrana y activación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) y el factor nuclear Kappa B y la óxido nítrico sintetasa (NOS) dependiente de calcio/calmodulina. Además también se estimularán células como macrófagos y neutrófilos, con una alta actividad NADPH oxidasa (figura 2). Todo ello desencadenará la producción radicales libres de oxígeno, peroxidación lipídica y producción de citoquinas con una respuesta inflamatoria hacia la lisis celular (8).

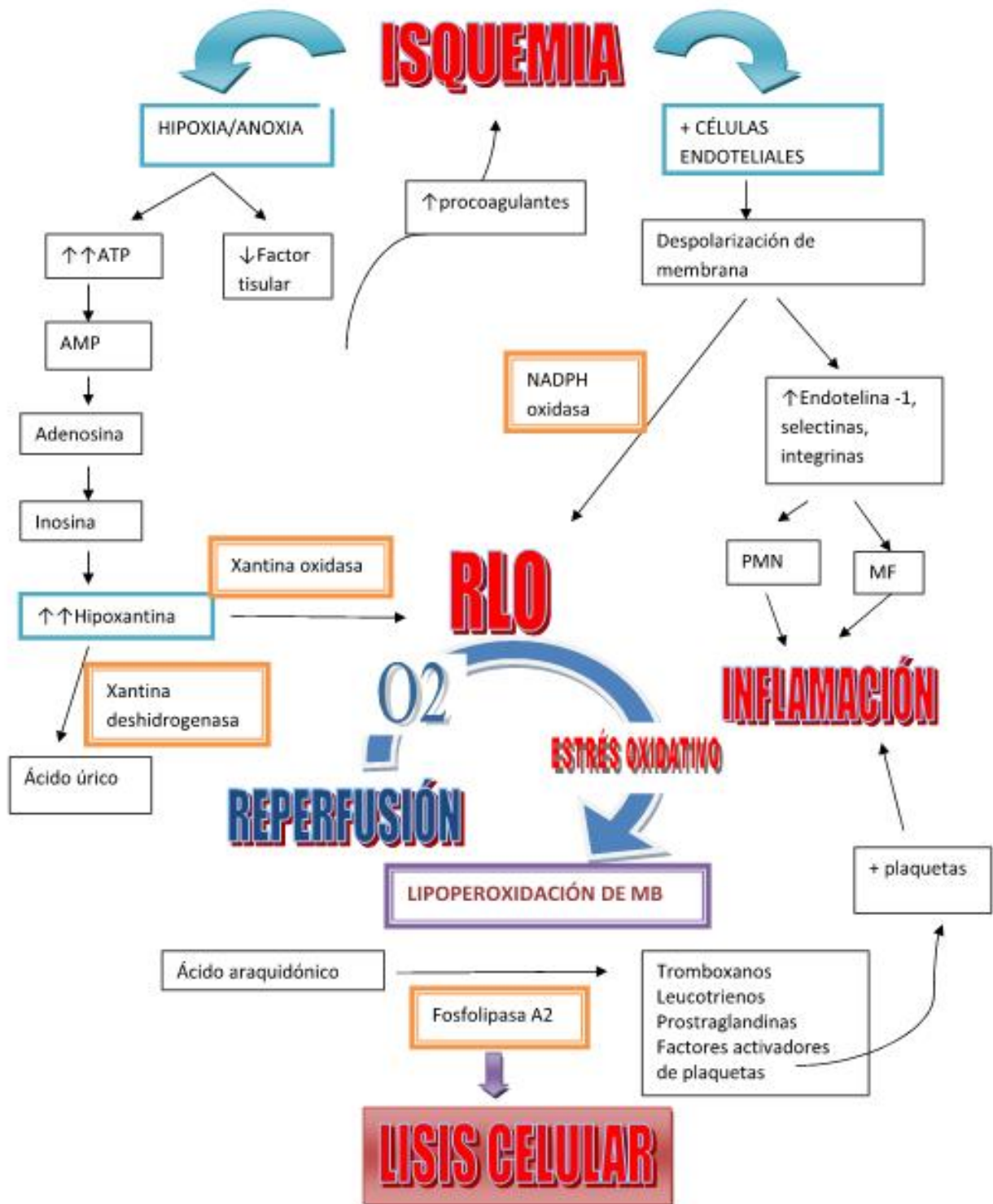


Fig 2: Vías de producción de la lisis celular a partir de la hipoxia e ischemia- reperfusión. MB: membrana; RLO: radicales libres de oxígeno; PMN: polimorfonucleares neutrófilos; MF: macrófagos; ATP: adenosín trifosfato; AMP: adenosín monofosfato.

1.2.2 Mediadores Celulares

El síndrome de isquemia reperfusión supone una reacción multifactorial de diversos factores inflamatorios como citoquinas, proteínas quimiotácticas y radicales libres de oxígeno (RLO) a través de diferentes células inflamatorias. La interferencia entre estas células, mediante diversas reacciones moleculares, genera una cascada de señales de iniciación y amplificación que finalmente culmina en el daño pulmonar.

Numerosos estudios han determinado que las células del sistema inmune (linfocitos T, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos) juegan un papel importante en este síndrome (5).

Por otro lado, células propias del pulmón como las células epiteliales alveolares y endoteliales, son también puntos críticos en la mediación de la lesión por isquemia-reperfusión (5).

La respuesta celular de isquemia-reperfusión puede dividirse en dos fases(8) (figura 3):

- Fase temprana: inmediatamente después de la reperfusión, mediada por la activación previa de los macrófagos durante la isquemia y liberación de citoquinas y otros mediadores.
- Fase tardía: A partir de las 24 horas de la reperfusión, potenciada por el reclutamiento de linfocitos y neutrófilos en el pulmón en el momento de la reperfusión.

1.2.2.1 Macrófagos: Los Macrófagos alveolares pueden producir un abundante número de citoquinas y agentes procoagulantes en respuesta al estrés oxidativo.

Se ha demostrado la gran importancia de estas células en la respuesta temprana postreperusión activándose durante la fase de isquemia, y liberando posteriormente mediadores como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), el interferón gamma (IFN- γ) y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1)(8-10).

1.2.2.2 Linfocitos: Se ha observado también la implicación de los linfocitos, predominantemente linfocitos T y natural killer (NK) en este síndrome. Pueden ser activados por reactivos de oxígeno y citoquinas. Se acumularán rápidamente en la fase de la reperusión, y participarán en la fase tardía mediante la liberación de IFN- γ (8).

1.2.2.3 Neutrófilos: Desempeñan un papel importante, a partir de las primeras 24 horas post-reperusión y en la perpetuación del daño pulmonar, liberando radicales libres de oxígeno y produciendo una disfunción de la membrana epitelio-capilar que desencadenará aumento de permeabilidad microvascular y edema pulmonar, llegando incluso al daño tisular irreversible (5;8).

Su periodo de activación comenzará de forma tardía a partir de al menos 4 horas postreperusión (periodo neutrófilo dependiente), mostrando de esta forma una escasa participación en las primeras horas, donde los macrófagos jugarán el papel primordial (periodo neutrófilo independiente).

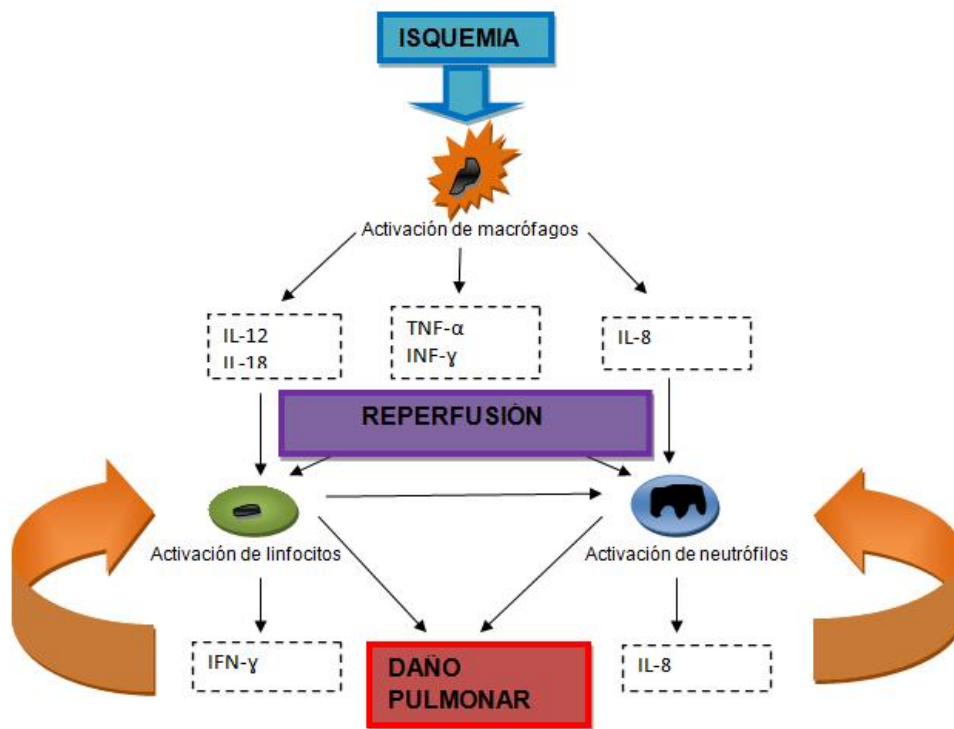


Fig 3. Patrón bifásico de activación de los mediadores celulares en la isquemia-reperfusión.

IL-8, IL-12, IL-18: Interleukina 8, 12 y 18; TNF- α : Factor de necrosis tumoral; INF- γ : interferón gamma.

1.2.2.4 Células epiteliales alveolares: Las células alveolares tipo II, contribuyen al daño por isquemia-reperfusión con la liberación de citoquinas proinflamatorias y proteínas quimiotácticas, así como promoviendo la infiltración tisular por neutrófilos (5).

1.2.2.5 Células endoteliales: El aumento de permeabilidad endotelial se ha definido como la primera causa de edema en el fenómeno isquemia-reperfusión. Estas células endoteliales también participan en el daño tisular mediante la producción de RLO durante el estrés oxidativo a través de la vía NADPH oxidasa,

aumentando así la concentración de reactivos de oxígeno durante la reperfusión (5;9).

Por tanto, la prevención del daño en la barrera endotelial será un punto crucial para la atenuación de los efectos del síndrome por isquemia reperfusión.

1.2.3 Mediadores Inflamatorios

La activación de los fagocitos del pulmón, tanto los propios del pulmón como las células fagocíticas reclutadas (macrófagos, monocitos, neutrófilos...), resulta en una serie de productos importantes para el desarrollo del daño inflamatorio del pulmón.

El entendimiento del mecanismo de activación celular y de cómo los productos de estas células activadas interaccionan para desencadenar el daño pulmonar es importante. Con ello se desarrollará posteriormente el tipo de intervenciones destinadas al bloqueo de las mismas, con el objetivo de tratar este síndrome postreperfusión.

De entre los mediadores inflamatorios, destacan las citoquinas, el sistema del complemento, las moléculas de adhesión y los factores de transcripción. Su cuantificación en los tejidos dañados, servirá para medir el nivel de respuesta inflamatoria.

1.2.3.1 Citoquinas/quimioquinas: Son proteínas moleculares secretadas desde la médula ósea por los macrófagos y secundariamente por linfocitos T. Ha sido demostrado que juegan un papel importante en el daño por isquemia reperfusión en hígado, riñón, corazón, intestino delgado, piel, y más recientemente en pulmón

(11-14). La producción de citoquinas suele ser transitoria y limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo.

Entre ellas destacan (tabla 1):

1.2.3.1.1 Interleuquina 1: La interleuquina 1- β (IL- β) es una proteína de 153 aminoácidos, producida predominantemente por monocitos y macrófagos activados, aunque ha sido también demostrada su producción por queratinocitos, células endoteliales, neutrófilos, fibroblastos, y células de músculo liso. Está implicada en fenómenos inflamatorios al liberar histamina por parte de los mastocitos, y aumentando la liberación de otros mediadores inflamatorios como las prostaglandinas, leucotrienos e IL-8. Está relacionada con la síntesis de RLO en el SIR pulmonar (15;16).

1.2.3.1.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α): Es una citoquina de 157 aminoácidos, secretada por una amplia variedad de células incluyendo macrófagos, monocitos, células T, células natural killer, y neutrófilos. Es un mediador inflamatorio local, pero a nivel sistémico se ve implicado también en el *shock* séptico y la coagulación intravascular diseminada. Produce activación del endotelio a nivel local y liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular (15;17).

1.2.3.1.3 Interleuquina 10: Es una citoquina antiinflamatoria que regula la intensidad del daño inflamatorio controlando el nivel de TNF- α producido y la actividad de diferentes moléculas de adhesión. Se ha visto que sus niveles después de la reperfusión están inversamente

correlacionados con la edad del paciente, lo que puede explicar que los pacientes de mayor edad sean más susceptibles al daño por isquemia-reperfusión y estén asociados a mayores tasas de mortalidad (5;8).

Tabla 1: Origen y función de las citoquinas potencialmente implicadas en el daño pulmonar postreperfusión.

CITOQUINAS	CÉLULAS DE ORIGEN	FUNCION
TNF- α	Macrófagos, linfocitos	Proinflamatoria
IFN- γ	Linfocitos	Proinflamatoria
MCP-1	Células inmunes y epiteliales pulmonares	Quimiotaxis de macrófagos
IL-1 β	Macrófagos, fibroblastos	Proinflamatoria
IL-2	Linfocitos	Proliferación células T
IL-6	Macrófagos, células endoteliales y epiteliales	Proinflamatoria
IL-8	Macrófagos, células epiteliales y fibroblastos	Quimiotaxis de neutrófilos
IL-10	Macrófagos, linfocitos	Antiinflamatoria
IL-12	Macrófagos	Activación de células T
IL-18	Macrófagos	Activación de células T

IL= Interleuquina; MCP-1= proteína quimiotáctica del monocito-1, TNF= Factor de Necrosis Tumoral.

1.2.3.1.4 Proteína Quimiotáctica del Monocito-1: Las Quimioquinas fueron identificadas en 1977 tras la depuración del factor plaquetario 4 (FP4). Desde entonces, los estudios han indentificado más de 50 quimioquinas y 20 receptores. Constituyen un subgrupo de citoquinas quimiotácticas y son subdivididas en cuatro familias según el número y espacio del residuo de cisteína conservada en el N-terminal de la molécula. De esta forma son nombradas CXC, CC, CX₃C y C de acuerdo con la nomenclatura (tabla 2)(18-20).

Se secretan en respuesta a señales de citoquinas proinflamatorias y juegan un papel primordial en el reclutamiento selectivo de monocitos, neutrófilos y linfocitos (19;20).

Las quimioquinas se agrupan también en dos subfamilias funcionales (20): inflamatorias y homeostáticas. Las quimioquinas inflamatorias controlan el reclutamiento de leucocitos en la inflamación y daño tisular, mientras que las quimioquinas homeostáticas cumplen tareas relacionadas con la navegación de leucocitos a órganos linfoides secundarios así como en la médula ósea y el timo durante la hematopoyesis.

Tabla 2: Diferentes receptores de Quimioquina y sus ligandos. Sus diferentes funciones: I= inflamatoria; H= Homeostasis; D= Inflamatoria y homeostasis; U= desconocida.

Familia	Nomenclatura sistemática	Ligando(nombre alternativo)	Receptor	Cromosoma	Función
Quimioquina C(γ quimioquina)	XCL1	Linfotactina, ATAC, SCM-1-	XCR1	1q24.2	D
	XCL2	SCM-1 β	XCR1	1q24.2	D
	CCL1	I-309	CCR8	17q11.2	I
	CCL2	MCP-1, MCAF, TDCF	CCR2	17q11.2	I
	CCL3	MIP-1 α , LD78 α	CCR1, CCR5	17q12	I
	CCL3L1	LD78 β		17q12	I
	CCL3L3	LD78 β		17q12	I
	CCL4	MIP-1 β	CCR5	17q12	I
	CCL4L1	AT744-2		17q12	I
	CCL4L2			17q12	I
	CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	17q12	I
	CCL6	Desconocido	Desconocido	17q12	I
	CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3	17q11.2	I
	CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	17q11.2	I
	CCL9/CCL10	Desconocido	CCR1		
	CCL11	Eotaxina	CCR3	17q11.2	I
Quimioquina CC(quimioquina β)	CCL12	Desconocido	CCR2		
	CCL13	MCP-4	CCR1, CCR2, CCR3	17q11.2	I
	CCL14	HCC-1	CCR1	17q12	H
	CCL15	HCC-2, Lkn-1, MIP-1 δ	CCR1, CCR3	17q12	H
	CCL16	HCC-4, LCC-1, LEC	CCR1, CCR2, CCR5	17q12	H
	CCL17	TARC	CCR4	16q13	D
	CCL18	PARC, DC-CK1, AMAC-1	Desconocido	17q12	H
	CCL19	ELC, Exodus-3, MIP-3 β	CCR7	9p13.3	H
	CCL20	LARC, Exodus-1, MIP-3 α	CCR6/2q36.3	D	
	CCL21	SLC, 6CKine, Exodus-2	CCR7	9p13.3	D
	CCL22	MDC, STCP-1	CCR4	16q13	D
	CCL23	MPIF-1, Ck β 8, MIP-3	CCR1	17q12	I
	CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2	CCR3	7q11.23	I
	CCL25	TECK	CCR9	19p13.3	H
	CCL26	Eotaxin-3	CCR3	7q11.23	I
	CCL27	CTACK, ILC	CCR10	9p13.3	H
	CCL28	MEC	CCR3, CCR10	5p12	U
	CXCL1	GRO α , MGS α	CXCR2, CXCR1	4q13.3	I
	CXCL2	GRO β , MGS β	CXCR2	4q13.3	I
	CXCL3	GRO γ , MGS γ	CXCR2	4q13.3	I
	CXCL4	PF-4	CXCR3B	4q13.3	U
	CXCL4VI			4q13.3	U
	CXCL5	ENA-78	CXCR2	4q13.3	I
	CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	4q13.3	I
	CXCL7	NAP-2	Desconocido	4q13.3	I
Quimioquina CX α C(Quimioquina δ)	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	4q13.3	I
	CXCL9	MIG	CXCR3-A, CXCR3-B	4q21.1	I
	CXCL10	IP-10	CXCR3-A, CXCR3-B	4q21.1	I
	CXCL11	I-TAC	CXCR3-A, CXCR-B	4q21.1	I
	CXCL12	SDF-1 α/β	CXCR4, CXCR7	10q11.21	H
	CXCL13	BCA-1, BLC	CXCR5	4q21.1	H
	CXCL14	BRAK, Bolekine	Desconocido	5q31.1	I
	CXCL15	Desconocido	Desconocido		
	CXCL16		CXCR6	17p13	I
	CXCL17	DMC	Desconocido	19	U
Quimioquina CX α C(quimioquina δ)	CX α CL1	Fractalkine	CX α CR1	16q13	I

La estructura de las quimioquinas comprende tres dominios diferentes (figura 4) donde se ha comprobado que la región N-Terminal es el importante receptor de enlace y activación (19;20).

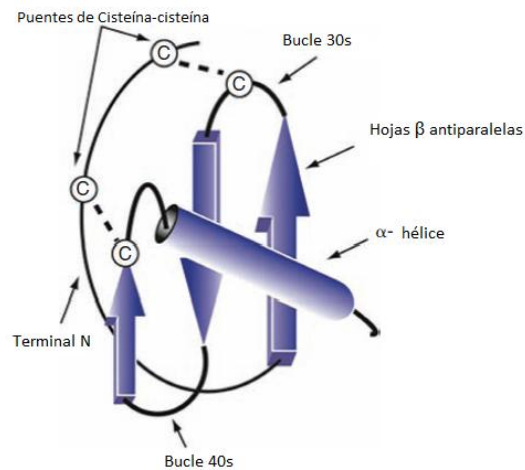


Fig 4: Representación esquemática de la estructura tridimensional de las quimioquinas (18).

Finalmente, además de estas funciones en el sistema inmunitario, estarán también envueltas en la patogénesis de un número amplio de enfermedades como el SIDA, enfermedades autoinmunes (psoriasis, artritis reumatoidea, esclerosis múltiple...), enfermedad pulmonar (asma y EPOC), cáncer y enfermedades vasculares (20-24).

La proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1/ CCL2), en adelante MCP-1, es miembro de la familia de C-C quimioquinas, y fue originariamente caracterizada como el producto de los fibroblastos del ratón mediante la inducción del factor de crecimiento plaquetario. Desde su descubrimiento, ha sido definida como activadora de monocitos in vitro, tanto en humano como en ratón, y demostrada su capacidad de reclutarlos en focos de inflamación activa (19;25-27).

CCL2 fue la primera C-C quimioquina descubierta en humano, localizada en el cromosoma 17. La MCP-1 humana está compuesta de 76 aminoácidos (figura 5).

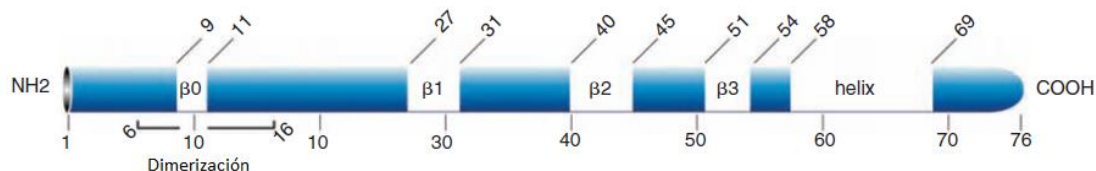


Fig 5: Representación esquemática de la estructura de CCL2 (18).

La MCP-1 es expresada por numerosas células incluyendo macrófagos, fibroblastos, endotelio, músculo liso y células epiteliales, y puede modular la producción de citoquinas, la expresión de moléculas de adhesión y la proliferación de células mononucleares (28).

Se cree que la MCP-1 juega un papel crucial en el síndrome isquemia-reperfusión ya que previamente se ha observado alteración en los niveles de C-C quimioquina en un modelo experimental en cerdo de isquemia-reperfusión (29). Además, su expresión ha sido demostrada en otros modelos de inflamación (tabla 3) como la encefalomielitis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis pulmonar o peritonitis aguda (25;30;31).

Una compleja red de citoquinas y quimioquinas actuarán durante diferentes fases de la respuesta inflamatoria pero la naturaleza exacta de estas relaciones permanecen aun inciertas. Entre ellas, se ha visto en el SIR una posible interrelación entre la IL-1, TNF- α y su capacidad para potenciar la activación de la MCP-1, tras un episodio de hipoxemia y posterior contacto con radicales libres de oxígeno en el SIR (32;33).

Tabla 3: Implicación de la CCL2/MCP-1 en diferentes enfermedades.

Efectos	Mecanismos	Referencias
Trombogénesis	Por generación de factor tisular	Charo , Taubman 2004
Tuberculosis	Niveles bajos de IL-12 p40	Flores-Villanueva et al 2005
Tolerancia inmune en endometriosis	Apoptosis de LinfocitosT	Salem et al 2006
Aborto involuntario recurrente	IL-1 β inducida por MCP-1	Huang et al 2006
Eliminación vírica del SNC	Aumento de infiltración de LinfocitosT	Carmen et al 2006
Esclerosis Múltiple Esclerosis Múltiple progresiva secundaria	Correlación entre CCL2 y daño axonal. CCL2 y IP-10 en astrocitos hipertróficos	Tanuma et al 2006
Nocicepción	CCL2 mediado por despolarización de neuronas	Sun et al 2006
Complicación neuronales VIH	Tat regulación por COX-2,MCP-1,IL β ,TNF α y iNOS, y activación de células microglia	Floraet al2005
Retinopatía oxígeno inducida	Marcado aumento de CCL2 en microglia/macrófagos	Davies et al 2006
Empeoramiento neurocognitivo en VIH	Correlación entre MCP-1 plasmático y TNF α en tejidos	Ragin et al 2006
Neovascularización Tumoral	Influencia de CCL2 por infiltración de macrófagos	Wang et al 2006
Desensibilización cerebral, influencia de agentes farmacológicos neuronales como opioides y cannabinoides	Interacción intracelular de quimiquinas con neurotransmisores sistémicos	Adler et al 2006
Nefropatía	Fosforilación de p38 MAPK	Granata et al 2006
Enfermedad Intestinal Inflamatoria	Diferenciación de macrófagos intestinales mediante CCL2	Spoetl et al 2006
Asma alérgico	Liberación inducida de IL-4 y IL-3 por CCL2 en epitelio bronquial	Ip et al 2006
Artritis reumatoide	Aumento de CCL2	Rantapaa-Dahlqvist et al 2007
Resistencia a Insulina	Aumento MCP1,TNF α y IL6	Kamei et al 2006
Muerte neuronal por isquemia	Astocitos expresan CCL2, MIP- α y sus receptores	Sakurai-Yamashita et al 2006
Daño por toxicidad neuronal(NMDA)	Producción de CCL2 por astrocitos	Katayama et al 2002

1.2.3.2 Moléculas de Adhesión

Las moléculas de adhesión pueden ser diferenciadas en tres grandes familias: integrinas, selectinas e inmunoglobulinas. La emigración de leucocitos supone los eventos secuenciales de circulación, activación y extravasación.

Su circulación será fruto de una interacción endotelio-leucocito mediado por las selectinas. Su posterior adhesión estará provocada por las integrinas (B1 integrina y B2 integrina) y finalmente la extravasación al tejido será dependiente de la interacción integrina-inmunoglobulina.

Estas moléculas de adhesión serán sintetizadas en el endotelio durante la fase de isquemia, por lo que su bloqueo en el momento de la reperfusión puede reducir el daño del SIR (8).

1.2.3.3 Sistema del complemento

El sistema del complemento se refiere a un término colectivo usado para proteínas de membrana celular y factores plasmáticos. La activación de productos del complemento, produce contracción del músculo liso, y aumento de permeabilidad vascular, induciendo la degranulación de células fagocíticas, mastocitos, y basófilos.

Estudios sobre el daño pulmonar por isquemia-reperfusión han demostrado que la activación del sistema de complemento tras la reperfusión, provoca el daño celular mediante mecanismos directos e indirectos (5;8).

1.2.3.4 Factores de Transcripción:

La activación de diversas citoquinas, ha sido relacionada con el aumento de expresión de factores de transcripción como es el caso del factor de necrosis kappa beta (NF-kB). En el citoplasma, NF-kB es normalmente inhibida por IκB. Previniendo la degradación de IκB mediante agentes farmacológicos, conseguiremos un descenso de actividad de NF-kB y por tanto una atenuación de la activación de citoquinas proinflamatorias (5).

Por el contrario, la fosforilación de IκB en IκB-P mediante la IκB quinasa (IKK) producirá su propia degradación y por tanto la activación de NF-kB (34).

1.3 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

El objetivo fundamental de entender los numerosos tipos celulares y mediadores moleculares que se interrelacionan entre sí, de forma compleja, en el SIR consiste en intentar disminuir de alguna manera los efectos dañinos de esta respuesta inflamatoria, tanto a nivel local como a nivel sistémico. Es por ello que han surgido numerosos trabajos demostrando modulaciones sobre diferentes factores del SIR.

1.3.1 Soluciones de preservación pulmonar: Las soluciones que han sido utilizadas son principalmente las intracelulares (potasio elevado, sodio bajo) como el Euro-Collins y Solución de la Universidad de Wisconsin, y las extracelulares (potasio bajo, sodio elevado) como la LPD (low-potassium dextran) y Celsior. Históricamente, la solución Euro-Collins ha sido utilizada en la preservación renal, la Wisconsin en estudios hepáticos y Celsior para trabajos cardíacos. LPD es la única que ha sido específicamente desarrollada para manejo pulmonar. Actualmente la solución LPD-glucosa (Perfadex) ha sido clínicamente aprobada y

admitida en la mayoría de centros como la solución de preservación pulmonar (8). Las bajas dosis de potasio serán menos perjudiciales para la integridad estructural de las células endoteliales por lo que se liberarán menos vasoconstrictores pulmonares y oxidantes. El Dextrano reducirá la agregación de eritrocitos además de ofrecer un efecto antiagregante mediante la cobertura de células endoteliales y plaquetas, mejorando así la microcirculación y preservando la barrera endotelio-epitelio (35;36).

El realizar la perfusión, tanto en dirección anterógrada como retrógrada (a través de las venas pulmonares y drenaje por arteria pulmonar), añade ventajas como un mejor aclaramiento de hematíes en los capilares, mejor distribución de la solución en el árbol vascular y traqueobronquial y menor empeoramiento de la función del surfactante (8).

- 1.3.2 Temperatura y ventilación: La expansión pulmonar con oxígeno durante el periodo de isquemia se ha demostrado que protege al órgano del SIR por tres mecanismos: mantiene el metabolismo aeróbico, preserva la integridad del surfactante y mantiene el transporte epitelial de fluido. A pesar de ello, una hiperdistensión, por una excesiva presión ventilatoria, se ha visto que juega un papel perjudicial, así que debe controlarse entre 15-20 cm H₂O antes de pinzar la traquea (37;38). Una vez en el periodo de reperfusión, una estrategia de ventilación protectora con FiO₂ de 50% se ha demostrado que tendrá efectos beneficiosos (8;39). La preservación del órgano se realizará en hipotermia para reducir así

los requerimientos metabólicos(8). Existen diferentes recomendaciones respecto a la temperatura óptima de preservación pulmonar.

En la tabla 4 se muestran las recomendaciones del Grupo Investigador de Toronto para una adecuada preservación pulmonar.

Tabla 4: Recomendaciones para la preservación pulmonar del Grupo de Trasplante de Toronto.

Volúmen de solución de preservación	50-60 ml/Kg
Presión AP durante la perfusión de solución	10-15 mmHg
Temperatura de la solución	4-8°C
Ventilación pulmonar	VT: 10ml/Kg y PEEP:5cmH ₂ O
Oxigenación	≤ 50% F _i O ₂
Presión aérea de inflado pulmonar	15-20 cmH ₂ O
Temperatura de conservación	4-8°C

AP: Arteria Pulmonar; PEEP: presión positiva espiratoria

1.3.3 Óxido Nítrico: El Óxido Nítrico (NO) es un gas mensajero con múltiples efectos fisiológicos, entre ellos potentes propiedades vasorreguladoras e inmunomoduladoras. Es producida por una serie de enzimas (NOS) que catalizan su conversión desde L-Arginina. Al menos dos formas constitutivas de NOS son expresadas: NOS endotelial y NOS neuronal. Son responsables de la mayoría de los efectos beneficiosos del NO como la reducción de tono vascular y la prevención de adhesión plaquetaria y neutrofílica. En cambio, una forma inducible de NOS que se encuentra en una amplia variedad de células como macrófagos,

células endoteliales y epiteliales (NOS inducible) está implicada en la destrucción de organismos exógenos, la fisiopatología del shock séptico, la hipoxia por vasoconstricción y la lesión tisular (8;40).

El NO endógeno disminuye después del fenómeno de isquemia-reperfusión pulmonar en humano, probablemente destruido por los radicales libres de oxígeno y la liberación de inhibidores de NOS (41).

Se han desarrollado múltiples estrategias para compensar la caída de NO tras la perfusión, administrando NO, tanto inhalado como por vía intravenosa, así como moléculas responsable de su síntesis (L-Arginina entre otras)(42;43).

Sin embargo, el NO administrado durante la fase de isquemia o perfusión inmediata, puede reaccionar con anión superóxido y ácido peroxinitroso, que son oxidantes altamente reactivos, y desencadenar liberación de endotelina, lesión alveolar en células tipo II y daño estructural y funcional del surfactante (8;44;45).

Por lo tanto, el NO ha sido usado en la clínica satisfactoriamente para el tratamiento de SIR instaurados, pero su uso en la prevención del mismo durante las fases de isquemia-reperfusión permanece en controversia (8).

1.3.4 Prostaglandinas: Se ha demostrado el valor beneficioso de la PGE1 cuando es administrada junto a soluciones intracelulares como Euro-Collins y Wisconsin. Se atribuye su efecto a sus propiedades vasodilatadoras, que favorecen una mejor distribución de la solución de preservación. Su infusión continua durante la isquemia-reperfusión se utiliza también por sus efectos antiinflamatorios y antiagregantes de

plaquetas (8;46). Nuevos estudios, aun experimentales, están probando su administración vía inhalatoria para evitar el efecto secundario de hipotensión tras su administración sistémica (47).

1.3.5 Surfactante: El surfactante pulmonar consiste en aproximadamente el 90% lípidos, principalmente fosfatidilcolina, y el 10% proteínas, incluyendo las apoproteínas A, B, C y D. Los neumocitos tipo II sintetizan, acumulan, secretan y reciclan el surfactante pulmonar. Diferentes alteraciones durante la isquemia-reperfusión provocarán un déficit de absorción de surfactante, disminución de apoproteína A, alteración del metabolismo de fosfolípidos, distorsión de los neumocitos II y aumento de la proteína C reactiva. La administración de surfactante exógeno ha demostrado mejorar el intercambio gaseoso y complianza pulmonar tras la reperfusión e incluso hasta días después en pacientes trasplantados (8;48).

1.3.6 Precondicionamiento: Tejidos expuestos a un leve episodio de estrés, generan tolerancia a posteriores daños prolongados. En esta adaptación biológica consiste el concepto del preconditionamiento. Se han descrito diferentes tipos de preconditionamiento: leves periodos de isquemia (precondicionamiento isquémico)(49), de aumento de temperatura (precondicionamiento hipertérmico)(50), administración de agentes farmacológicos (precondicionamiento químico)(51) e incluso el uso de gases anestésicos halogenados como el sevoflurano antes de la isquemia (precondicionamiento anestésico)(52).

1.3.7 Otras estrategias: Existen otras estrategias en estudio como los inhibidores del complemento (53), antagonistas del factor activador de las plaquetas (54), quelantes de hierro (55), monóxido de carbono (56), inhibidores de las moléculas de adhesión (57), hemooxigenasa 1 (58), terapias génicas (59).

1.4 PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

El preconditionamiento isquémico (PI) es un fenómeno descrito por primera vez en 1986 por Murry et al en el corazón. Diseñó un experimento que demostró que la aplicación de breves episodios de isquemia-reperfusión repetitivos en el corazón reducía el tamaño de la necrosis ocasionada por una isquemia posterior prolongada (60). A partir de entonces, Murry definió el preconditionamiento isquémico como “una respuesta rápida y adaptativa a una isquemia breve, que enlentece la tasa de muerte celular durante un episodio posterior de isquemia prolongada”.

Este fenómeno se caracterizaba por estar asociado a una tasa reducida de consumo de ATP y por no depender de la circulación colateral, ya que se puso en evidencia hasta en animales que carecen de ella como ratas, conejos y cerdos.

Posteriormente se constató que la protección obtenida contra el SIR mediante el PI era aplicable a otros órganos con funcionalidad muy diversa como el músculo estriado (61), el cerebro (62), intestino (63), riñones (64), hígado (65) y pulmones (66). En cualquier caso, la tolerancia al SIR inducida por el PI es específica de cada órgano y cada especie animal, por lo que el número de ciclos de isquemia-reperfusión y su duración varían.

En el año 1993, dos grupos de investigadores, Marber et al en conejos (67), y Kuzuya en perros (68), descubrieron la reaparición del efecto protector 24 horas después del evento isquémico, al cual nombraron fase tardía del PI o segunda ventana.

De este modo podemos comprender el efecto protector del preconditionamiento isquémico en dos fases (figura 6):

- Fase Precoz o Temprana: A las 2-3 horas de la reperfusión.
- Fase Tardía o segunda ventana: A partir de las 12-24 horas, no tan pronunciada como la precoz, pero que su efecto puede continuar hasta 2-3 días después.

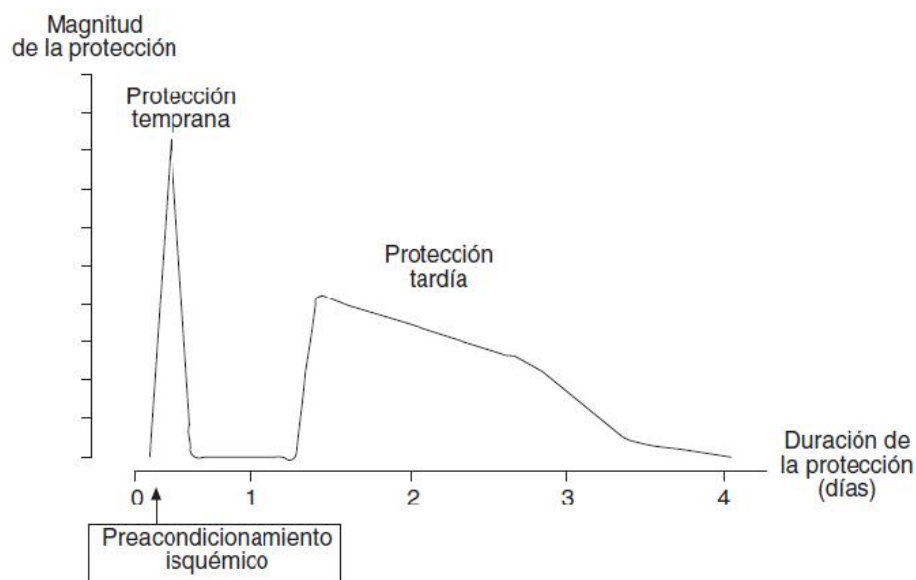
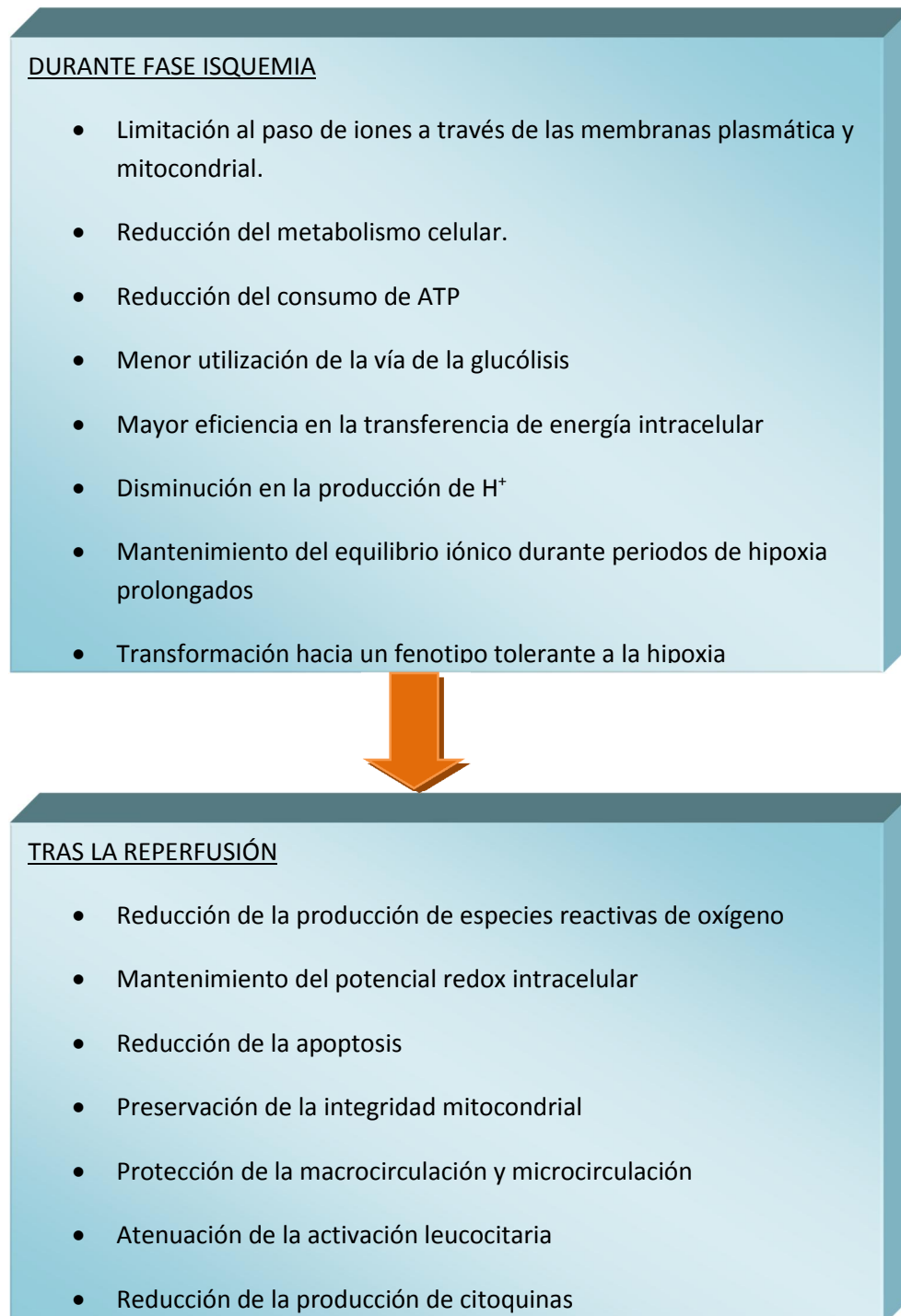


Fig 6: Magnitud y duración de las 2 fases del preconditionamiento isquémico. Figura tomada de Grande et al. Ischemic preconditioning of the liver: from molecular bases to clinical application. Cir Esp 2006 Nov;80(5):275-82.

En 1998 estos estudios llegaron al pulmón. Guohu Li et al publica un experimento con caninos donde se combinaba, en órgano donante, la difusión de solución preservadora Euro-Collins a 4°C con PI mediante oclusión de la arteria pulmonar durante 10 minutos. Se vió en este grupo una mejora del intercambio gaseoso, reduciendo la presión de la arteria pulmonar y el daño tisular postreperusión. Se demostró por tanto, una mayor protección en el grupo PI que en el control que solo había recibido lavado con solución de preservación (69).

Los mecanismos con los que el PI confiere protección son aun motivo de investigación en la actualidad. Se trata de una secuencia rápida de acontecimientos en la que una señal desencadena un mensaje intracelular y posterior amplificación de los mecanismos encaminados a la protección.

Tabla 5: Mecanismos de protección contra el SIR inducidos por el preconditionamiento isquémico



En el eje de esta secuencia aparecerán implicados el NO y la adenosina como moléculas principales, para luego promover la activación de múltiples señales

celulares. Varios estudios demuestran que en la fase de isquemia existen cantidades insuficientes de NO para contrarrestar de forma efectiva la presencia de factores vasoconstrictores como las endotelinas. A los pocos minutos del PI, se liberará adenosina al espacio extracelular. Ésta activa la forma constitutiva de la enzima NOS endotelial (eNOS), mejorando así, la oxigenación tisular y la microcirculación (65;70). La activación de los receptores de adenosina, estimulará la actividad de diversas quinasas, las cuales pueden inducir la expresión de factores de transcripción como el factor de necrosis kappa B (NFkB). Estos factores de transcripción modulan la expresión de determinados genes y síntesis de proteínas que serán responsables del efecto protector tardío (65;71). El papel beneficioso del NFkB permanece contradictorio, atribuyendo algunos autores los efectos del PI a su activación en vez de a su inhibición (65).

El PI es una estrategia muy efectiva para prevenir el estrés oxidativo incidiendo sobre el sistema xantina-oxidasa/xantina-deshidrogenasa, fuente principal de los RLO (72;73).

Existen, por tanto, diversos mediadores implicados en este fenómeno que han sido objeto de numerosos estudios experimentales en diferentes animales y diferentes órganos.

Es conocido también su efecto sobre algunas citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF- α que tras el PI, aparecerán disminuidas en el periodo postreperfusión. Se ha visto, en estudios anteriores, que a pesar de que el principal productor de TNF- α son los macrófagos durante la fase temprana del SIR, tras el PI, también continúa su efecto protector posteriormente en la fase tardía. Aunque no tiene implicación directa en el reclutamiento de neutrófilos,

seguirá influyendo en la liberación de citoquinas a partir de éstos y su interacción con el endotelio y, por tanto, en la permeabilidad vascular (74).

La reducción de la MCP-1 se ha demostrado en pulmón que tiene principalmente beneficio en la fase temprana a los 30 minutos de la reperfusión. Estos hallazgos se correlacionan bien con el hecho de que la función de esta quimioquina es altamente específica en la activación de monocitos/macrófagos (74).

MCP-1 es una quimioquina con gran importancia en la activación y reclutamiento de monocitos así como en la acumulación de neutrófilos en los lugares de inflamación (75). Naidu et al, demostraron el significativo efecto protector en el SIR tras administrar un inhibidor de quimioquinas sobre MCP-1, e incluso una disminución también en los niveles de TNF- α y secuestro de neutrófilos tras la reperfusión (76).

Por tanto, la MCP-1 tiene un papel crítico en la regulación de otras citoquinas/quimioquinas responsables del daño pulmonar, y su control será primordial para la modulación del SIR (75;77;78). Es también conocido que en numerosas células epiteliales como macrófagos alveolares o neumocitos tipo II, su expresión es desencadenada a partir de TNF- α e IL-1 y que éstos, a su vez, pueden ser inhibidos a través de PI (74;75;77;78).

Sin embargo, hasta la fecha, no existen estudios que relacionen directamente el PI y la modulación de MCP-1, ni traten sobre sus interrelaciones con TNF- α e IL-1 por lo que lo consideramos un objeto de investigación interesante para el nuestro trabajo.

1.5 MODELOS EXPERIMENTALES DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

Hasta la actualidad se han publicado numerosos estudios clínicos y experimentales sobre los efectos del SIR y del preconditionamiento isquémico.

El modelo experimental de autotransplante pulmonar fue ya inicialmente descrito en ovejas por Davies et al en 1965(79), pero la mayoría de estudios posteriores sobre SIR pulmonar, se basan en la isquemia fría (preservación del injerto a baja temperatura) (80;81).

La mayoría de estudios sobre el SIR en la isquemia caliente han sido realizados en pequeños roedores, mediante oclusión vascular (15;17;82), siendo menos frecuente su estudio a través de la isquemia normotérmica (83) y más escaso aun en grandes mamíferos (84). Van Raemdonck demostró que el tiempo máximo de tolerancia en isquemia caliente pulmonar en conejos era de una hora (83), mientras que Yamakazi en perros observó que el tiempo llegaba hasta 120 minutos, por lo que existe también cierta variabilidad según el tipo de animal que afectarán a los resultados (84).

Existirán situaciones clínicas que obliguen a someter al tejido pulmonar a periodos de isquemia más o menos prolongados, en las que no es posible un enfriamiento progresivo del órgano y donde el tejido sufre un episodio de isquemia caliente (normotérmica):

- Resecciones con broncoangioplastia en pacientes con tumores centrales y función respiratoria deteriorada (6;85).

- Trasplantes de lóbulo de donante vivo, una alternativa para la alta demanda de órganos y menor disponibilidad de donante cadáver(86-88)
- Reparaciones exsitu del pulmón en casos de hemorragias masivas.
- Autotransplante pulmonar en pacientes con tumores complejos mediante neumonectomía y lobectomía exsitu (7;89).

Para estudiar el SIR en este tipo de casos, el autotransplante pulmonar en grandes mamíferos es el que en mayor medida cumple ese objetivo. La técnica ya ha sido descrita en perros (84;90-93), ovejas (79) y cerdos (29;94).

Para comprobar los efectos del PI en el SIR pulmonar, hay diversos estudios experimentales en ratas (95), conejos (66) y perros (69;96), mediante oclusión intermitente del hilio pulmonar y posterior reperfusión, obteniendo diferentes resultados y aplicando diferentes tiempos de preconditionamiento isquémico entre 5 y 10 minutos. Incluso, existen casos publicados en humanos, como es el caso de Yang et al, que aplica el PI mediante oclusión del hilio pulmonar durante 10 minutos y posteriormente 10 minutos de reperfusión, en pacientes que se deben someter a una resección pulmonar mayor (97).

Sin embargo, son muy escasas las publicaciones que apliquen el PI en un modelo de autotransplante pulmonar en grandes mamíferos, que guardará una mayor similitud con las situaciones clínicas descritas con anterioridad y con la respuesta inflamatoria y resultados obtenidos en humanos.

Por todo ello, creemos que un modelo experimental de autotransplante pulmonar en cerdo, es un método reproducible, y el escenario que más se acerca a la práctica clínica descrita con anterioridad. De este modo estudiaremos el efecto de

la isquemia-reperfusión normotérmica, y la modulación de la MCP-1 y citoquinas proinflamatorias a partir del PI, así como su interrelación entre ellas.

Estos resultados marcarán nuevas expectativas en la regulación del SIR y en la utilización del PI como estrategia quirúrgica en situaciones de isquemia vascular prolongada.

2. HIPÓTESIS. OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

HIPÓTESIS PRINCIPAL

La isquemia-reperfusión en el pulmón podría producir, ya en fases iniciales, un estímulo quimiotáctico de monocitos y macrófagos que podría estar mediado, al menos parcialmente, por un aumento de la proteína quimiotáctica del monocito-1 (MCP-1). Esto podría ser modulado mediante el preconditionamiento isquémico del pulmón.

HIPÓTESIS SECUNDARIAS

1. El modelo de autotrasplante pulmonar en cerdo representa un modelo experimental que permite el estudio de los efectos locales y sistémicos de la isquemia reperfusión pulmonar.
2. El preconditionamiento isquémico podría modular en tejido pulmonar los cambios de expresión de MCP-1 inducidos por la isquemia reperfusión pulmonar.
3. Esta modulación de la expresión de MCP-1 por el PI podría estar relacionada con la modulación de la expresión de citoquinas inflamatorias y mediadores de la transcripción celular,
4. Esta modulación de la expresión de MCP-1 por el PI podría asociarse a un menor daño local y sistémico tras la isquemia reperfusión pulmonar.

2.2 OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar el posible efecto modulador del preconditionamiento isquémico pulmonar sobre la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y sobre la expresión de mediadores inflamatorios implicados en su regulación, en un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdos.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- 1- Estudiar, en dicho modelo experimental, si existe relación entre la expresión de citoquinas proinflamatorias y la expresión de MCP-1, en pulmón, durante el fenómeno de isquemia-reperfusión pulmonar, y analizar el posible papel regulador del PI pulmonar sobre la expresión de estas moléculas.
- 2- Estudiar si los cambios en la expresión de MCP-1 se asocian a cambios sobre el estrés oxidativo y activación leucocitaria en tejido pulmonar en fases precoces de la isquemia reperfusión y analizar el posible papel modulador del PI sobre estos cambios.
- 3- Estudiar, en este modelo experimental, si se observan, en el tejido pulmonar, cambios de expresión del mediador de transcripción celular NFkB que puedan relacionarse con cambios en la expresión de MCP-1.
- 4- Estudiar si esta posible regulación de la respuesta inflamatoria por el preconditionamiento isquémico se asocia a cambios fisiológicos en las fases precoces de la isquemia-reperfusión.

- 5- Estudiar si los cambios de expresión de MCP-1, en las diferentes condiciones del experimento, se asocian a diferentes grados de infiltración monocito-macrófagocitaria en muestras histológicas de tejido pulmonar.

.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

En 14 cerdos de la raza Large-White se realizó un procedimiento de autotransplante pulmonar ortotópico mediante neumonectomía izquierda, lobectomía craneal exsitu, reimplantación del lóbulo caudal y perfusión del mismo durante 30 minutos. Se clasificaron en grupo control (n=7) y grupo de preconditionamiento isquémico (PI) (n=7), en este último se pinzó la arteria pulmonar durante 5 minutos en dos ocasiones previo a la neumonectomía. Analizamos diferentes parámetros hemodinámicos, gasométricos y bioquímicos para el estudio del síndrome isquemia-reperfusión y el efecto del preconditionamiento isquémico.

3.1.1 Material Biológico: Animales

Se han utilizado 14 cerdos de la raza Large White con un peso entre 35 y 45 Kg.

Los animales proceden de la granja que el Instituto Tecnológico de Desarrollo Agrario de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid posee en el Complejo Agropecuario de Aranjuez (Finca “La Chimenea”).

El Instituto Tecnológico del Desarrollo Agrario es un establecimiento autorizado inscrito con el número EX 013-C en el registro Oficial de Establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales para la experimentación y otros fines científicos de la Comunidad de Madrid según la Orden de 4 de agosto de 1989 (BOCM de 24 de Agosto), vigente en el momento de la realización del estudio. En

este centro los cerdos se alojan en instalaciones construidas específicamente para ganado porcino, similares a las de una granja convencional, que garantizan su bienestar.

El traslado del cerdo hasta las instalaciones de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid se realiza 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, en una jaula individual en la que permanece hasta el momento de la intervención. El animalario dispone de un ambiente controlado con 20-22°C y humedad relativa del 55%.

El manejo de los animales se llevó a cabo siguiendo la normativa legal vigente en el momento de su realización según el Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre y B.O.E de 21 de Octubre de 2005 “Animales, protección de los utilizados para experimentación y otros fines científicos” (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) que incorpora las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los estados miembros de la CEE respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, de la Directiva del Consejo 86/609/CEE (Leg. 4390) aprobada el 24 de Noviembre de 1996.

3.1.2 Quirófano e instalaciones

El proyecto se ha llevado a cabo en el Quirófano de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, con nº de registro EX/017-U. Fue concedida la aprobación del Comité de Ética de Experimentación Animal y del Comité de Investigación de la institución (figura 7).



Fig 7: Quirófano de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Dicho quirófano consta de dos mesas quirúrgicas, cuatro lámparas quirúrgicas de alta intensidad y el equipo instrumental quirúrgico estándar así como el material de microcirugía y específico de cirugía torácica (figura 8).



Fig 8: Instrumental quirúrgico de Cirugía Torácica

Respecto al material anestésico, el quirófano está equipado con un respirador modelo Dräger SA 1 (Dräger Medical AG, Lübeck, Alemania), Capnógrafo Ohmeda 5250 RGM (General Electric Health care, USA), analizador de gases GEM Premiere 5000, Monitor de Swan-Ganz Gasto Continuo (Edwards, Irving, California, USA) y desfibrilador con palas externas e internas Life Pulse (HVE, Miami, USA).

3.1.3 Aparataje

- Tubos endotraqueales: Se utilizó el tubo estándar del número 5 al 7, dependiendo del tamaño del animal, modelo Murphy anillado con balón (figura 9).



Fig 9: Tubo endotraqueal de Murphy

- Transductores de presión: para monitorizar los parámetros hemodinámicos del sujeto de experimentación (presión arterial, presión pulmonar y presión venosa central), utilizamos transductores de presión desechables de Abbot IBP.

- Catéteres vasculares: para canalizar la arteria y vena femoral utilizamos mediante técnica de Seldinger, un catéter de 7 y 9.5 F respectivamente (Figura 10).

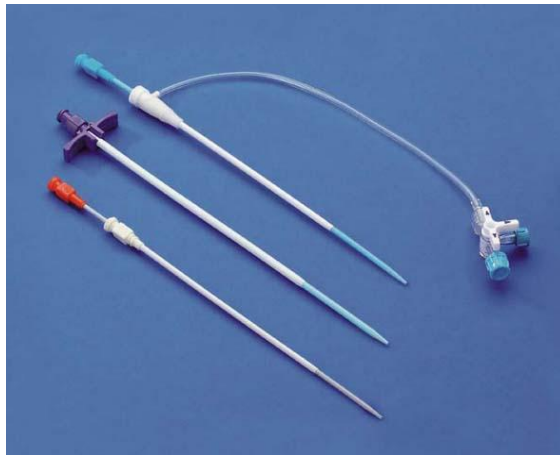


Fig 10: Catéteres vasculares

- Catéter de Swan-Ganz o catéter de la arteria pulmonar (CAP) (figura 11): Nos permite monitorizar de forma continua la presión en la arteria pulmonar, también permite adquirir de forma continua la saturación venosa mixta SVO₂ (en la punta del catéter, alojada en las venas pulmonares lobares) que será un parámetro íntimamente relacionado con la situación respiratoria, la hemoglobina del sujeto y el gasto cardiaco). Otra de sus funciones es medir el gasto cardiaco, mediante termodilución, es decir, mediante una fórmula matemática, calcula la diferencia de temperatura que existe entre la porción proximal y la punta del catéter, de un volumen de líquido determinado que inyectamos.

Por último, la última utilidad será la medición de la presión de enclavamiento o Presión Capilar Pulmonar (PCP) que será equivalente a la presión de la aurícula izquierda. De este modo, esta medición nos permite valorar la situación de precarga, su función ventricular y la función de la válvula mitral.

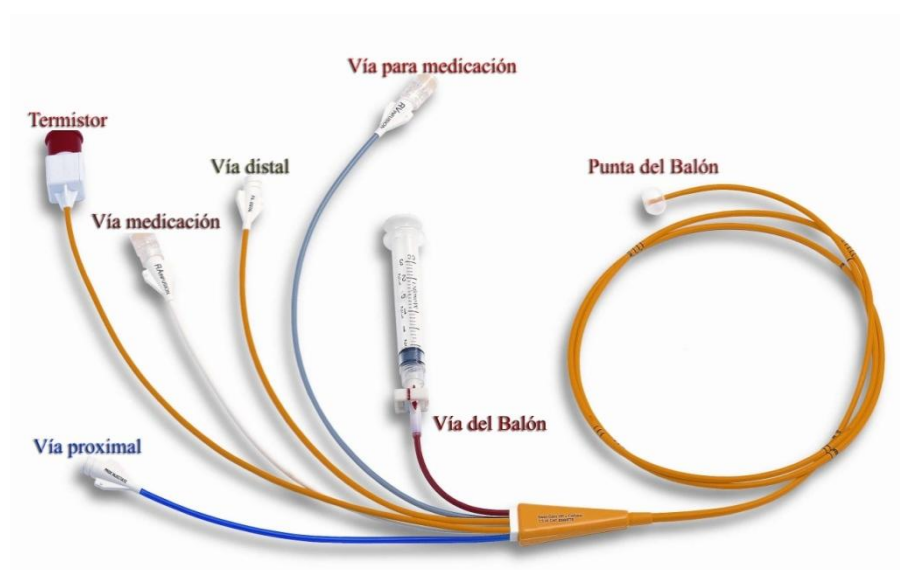


Fig 11: Componentes del catéter Swan-Ganz

En nuestro estudio, usamos un catéter de Swan-Ganz Edwards de 7.5F y longitud de 110cm, que en su extremo distal presenta un balón de látex, cuyo inflado tendrá la función de facilitar su progreso en la inserción a través de la corriente sanguínea, y reducir el riesgo de lesionar cavidades o producir arritmias. Posteriormente, una vez colocado correctamente, la luz proximal queda a nivel de la aurícula derecha, y la luz distal en la rama de la arteria pulmonar, y el inflado del balón en este momento producirá la determinación de presiones distales a éste (PCP)(figura 12).

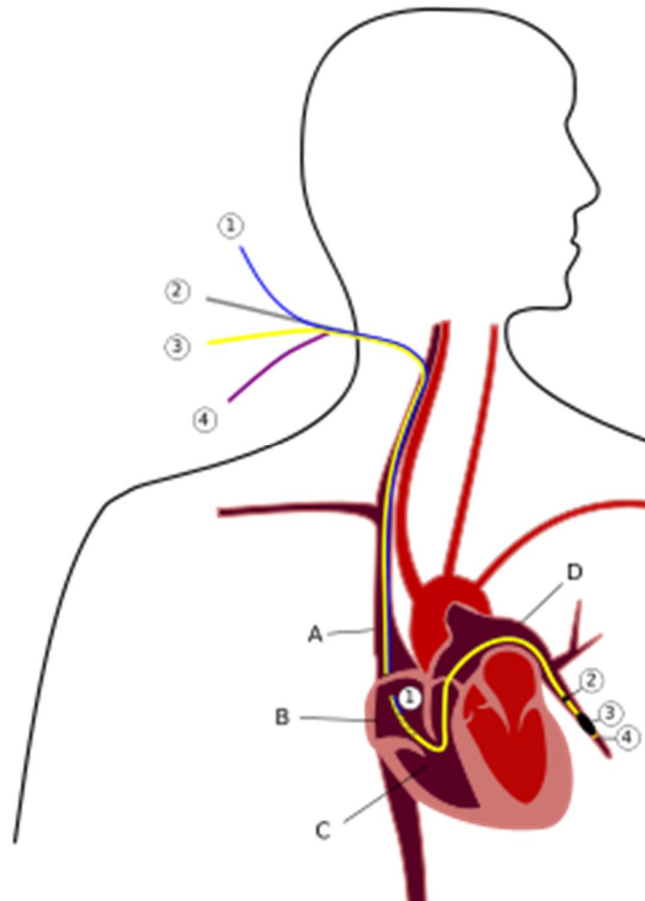


Fig 12: Diagrama del catéter Swan-Ganz: 1. Luz proximal. 2. Termistor. 3. Luz de inflado de balón. 4. Luz distal. A. Vena cava superior. B. Aurícula derecha C. Ventrículo derecho D. Arteria pulmonar.

3.2 MÉTODOS

El procedimiento consiste en la realización, bajo anestesia general, de un autotransplante del lóbulo caudal del pulmón izquierdo, mediante neumonectomía izquierda, seguida de lobectomía craneal izquierda exsitu, posterior reimplantación del lóbulo caudal izquierdo (figura 13) y reperusión durante 30 minutos.

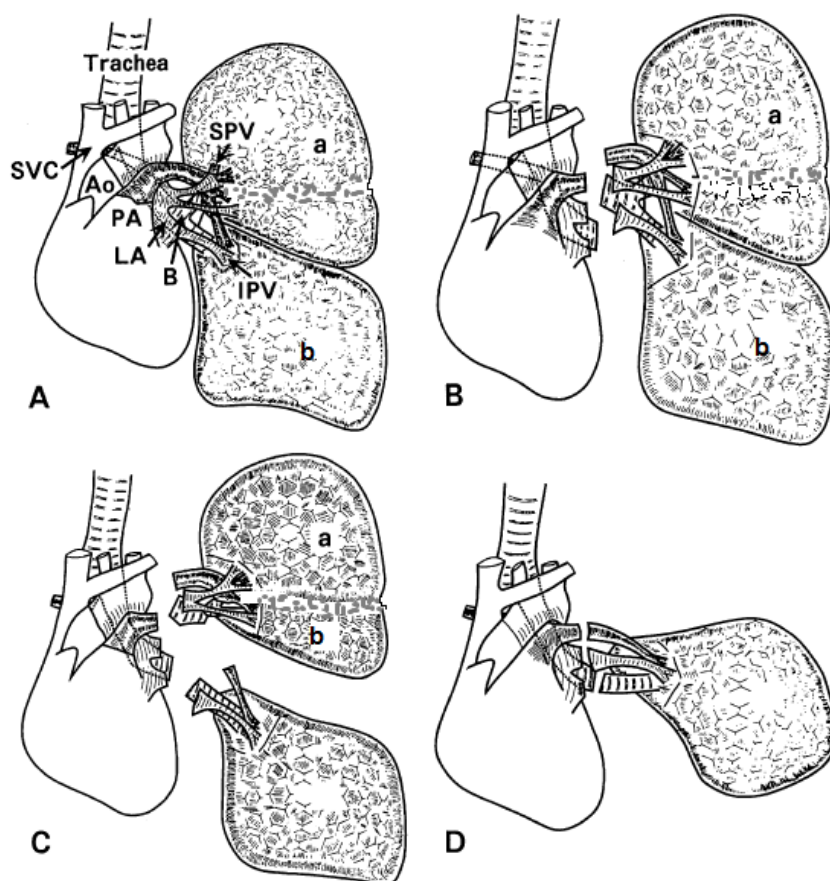


Fig 13: A: Anatomía pulmonar. B: Neumonectomía izquierda. C: Lobectomía craneal exsitu. D: Implante de lóbulo caudal. SVC: Vena Cava superior, Ao: Aorta, PA: Arteria Pulmonar, LA: Aurícula izquierda, B: Bronquio principal, SPV: Vena pulmonar craneal, IPV: Vena pulmonar caudal, a: Lóbulo craneal, b: Lóbulo caudal. Figura tomada de Matsumoto I et al. Experimental study of extracorporeal lung resection in dogs: ex situ sleeve resection and autotransplantation of the pulmonary lobe after extended pneumonectomy for central lung cancer 3. J Thorac Cardiovasc Surg 2004 May;127(5):1343-9.

Los animales fueron divididos en dos grupos: Grupo control (GC=n7) y Grupo Precondicionamiento Isquémico (GPI=n7) en el que se llevó a cabo el pinzado de la arteria pulmonar durante dos ciclos de 5 minutos, previo a la neumonectomía.

3.2.1 Monitorización y técnica anestésica

Los cerdos permanecieron en ayunas para alimentos sólidos 18 horas antes de la intervención, permitiendo el consumo de agua hasta el momento de la cirugía.

Quince minutos antes del comienzo de la inducción se les administró como premedicación ketamina ("Ketoral", Parker Davis) intramuscular 10mg/kg.

Posteriormente, se canalizó una vía periférica, preferiblemente la vena del dorso de la oreja, con un catéter calibre 20-22G.

La inducción anestésica se llevó a cabo con fentanilo ("Fentanest", Kern Farma) a 3µg/kg, propofol ("Diprivan", Astra Zeneca Farmaceútica, Madrid, España) a 4mg/kg y atracurio ("Tracrium" Glaxo Smith Kline, Uxbridge, Reino Unido) a 0.6mg/kg.

Se procede a la intubación orotraqueal (tubo número 5-7) (figura 14) y se conecta a ventilación mecánica controlada con respirador Dräger SA 1, con FiO₂ de 1, entre 12-15 respiraciones por minuto, relación inspiración-espriación 1:2 y 8-10 ml/kg de volumen corriente para mantener normocapnia (CO₂ entre 35-40mmHg).

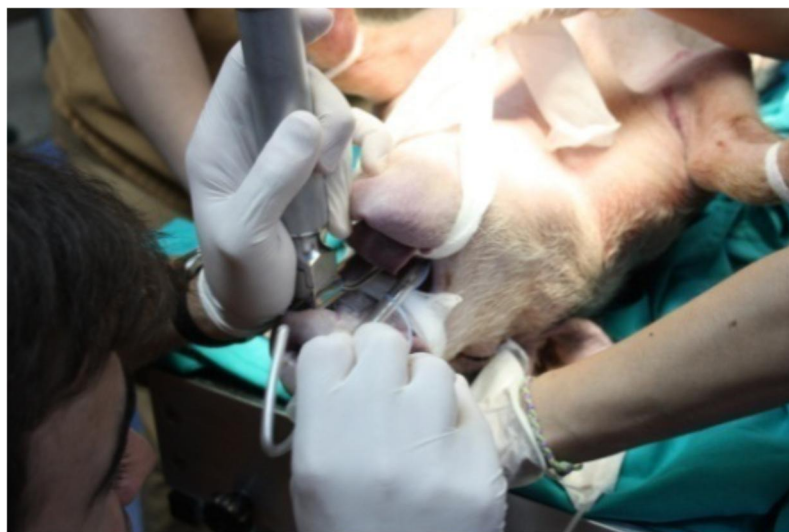


Fig 14: Intubación orotraqueal

El mantenimiento anestésico se realizó con perfusión continua de propofol al 2% a 8-10mg/kg/h, además de dosis suplementarias de fentanilo y atracurio según las necesidades del animal.

Se mantuvo una perfusión de cristaloides a 5-6ml/kg/h y, si fue preciso en caso de sangrado o hipotensión, soluciones de coloide (hidroxietilalmidón).

Se canalizaron la arteria (9F) y vena femoral (7.5F) de modo percutáneo. En los casos en los que no fue posible, se procedió a la disección quirúrgica del paquete vasculo-nervioso inguinal, individualizando arteria y vena femoral, y canulándolos mediante técnica de Seldinger (figura 15).

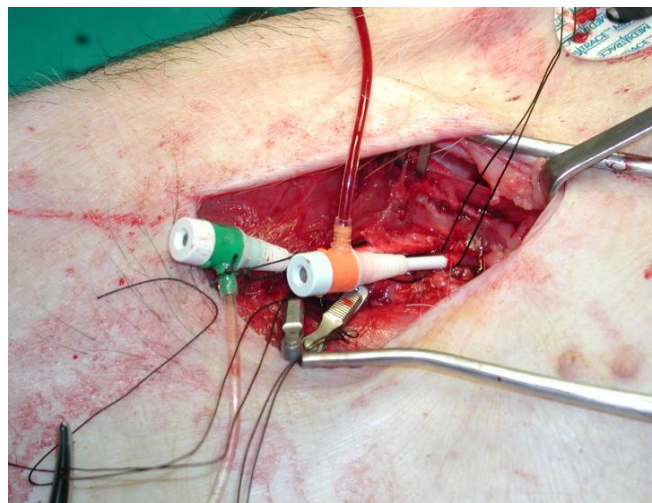


Fig 15: Canalización quirúrgica de arteria y vena femoral

A través de la vena femoral, se introdujo el catéter de Swan-Ganz hasta la arteria pulmonar derecha, guiándose por monitorización continuada de la curva de presión. El catéter de la arteria femoral fue usado para monitorización de la presión arterial y toma de muestras.

Se realizó también una traqueostomía con el fin de sustituir el anterior e introducir a su través un nuevo tubo endotraqueal, que posteriormente se progresará hasta el bronquio principal derecho para la ventilación selectiva.

Por último, la diuresis fue medida de forma horaria, mediante una cistostomía suprapúbica por minilaparotomía.

3.2.2 Procedimiento quirúrgico

Tras estos procedimientos preliminares, se colocó al animal en decúbito lateral derecho. Antes de comenzar la intervención quirúrgica, se lavó la piel del animal con una solución yodada. Se comenzó con la realización de una toracotomía izquierda a través del cuarto espacio intercostal, con costectomía inferior.

Procedimos después a la disección de la vena ácigos, que impide la correcta visualización del hilio pulmonar. A continuación seguimos con la disección de la vena pulmonar craneal y arteria pulmonar principal izquierda hasta llegar a su origen en la bifurcación del tronco arterial.

Seguidamente, seccionamos el ligamento pulmonar, y se disecan la vena pulmonar caudal y el bronquio principal izquierdo.

Hasta este momento, la cirugía se estuvo realizando con ventilación bipulmonar. En este punto, se seccionó el bronquio principal izquierdo, y se progresó el tubo endotraqueal hasta el bronquio principal derecho, con control visual directo, comenzando así la ventilación unipulmonar derecha (se redujo el volumen tidal a 6ml/kg para una ventilación protectora).

La arteria pulmonar izquierda se ocluyó con una pinza protegida cerca de la bifurcación del tronco pulmonar y se seccionó distalmente dejando un margen de

unos 5-10mm para la posterior anastomosis. La vena pulmonar craneal fue ligada cerca de la aurícula y seccionada. Para completar la neumonectomía izquierda, la vena pulmonar caudal se pinzó cerca de la desembocadura de la vena del lóbulo mediastínico (lóbulo característico en el cerdo que recibe ventilación e irrigación arterial pulmonar del lado derecho y drena en la aurícula izquierda), se seccionó a 1-2 mm de la pinza y se suturó con un punto continuo de polipropileno 6/0 ("Prolene", Ethicon, INC, Somerville, New Jersey, USA). Conservar la mayor longitud de vena pulmonar caudal, nos facilitó posteriormente la anastomosis veno-auricular durante el reimplante.

Para prevenir la trombosis de la arteria pulmonar, que se mantenía pinzada hasta la reperusión, se realizó heparinización sistémica 300UI/kg (Mayne Pharma España, S.L.).

A continuación, se procedió a la cirugía de banco. Primeramente se perfundió a través de la arteria pulmonar (perfusión anterógrada) y a través de las venas pulmonares (perfusión retrógrada) con un litro de perfusión Wisconsin a 10-15°C, mientras que al mismo tiempo se ventiló el injerto con un ambú (FiO₂ 21%).

Se llevó a cabo la lobectomía craneal exsitu (figura 16). El pedículo del lóbulo caudal lo constituían la arteria pulmonar izquierda, con ligadura y sección de sus ramas craneales, la vena pulmonar caudal liberada hasta sus ramas segmentarias para proporcionar la mayor longitud de la misma, y el bronquio principal izquierdo, con su bronquio craneal seccionado y suturado.

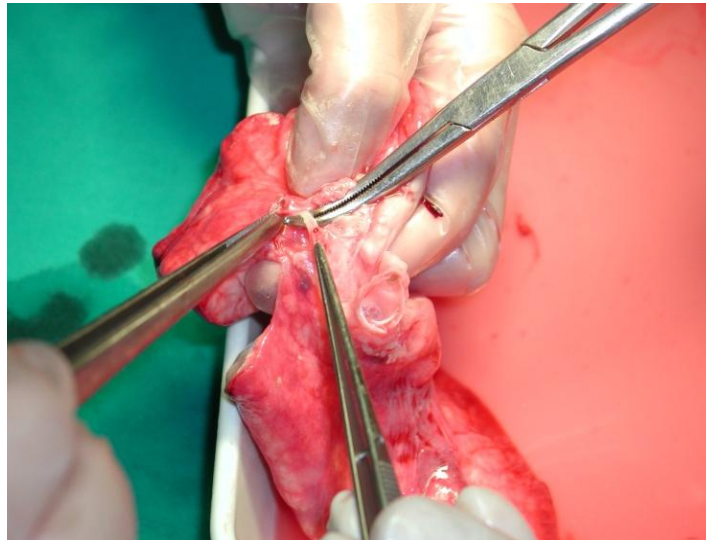


Fig 16: Lobectomía craneal exsitu.

Finalmente, el lóbulo caudal fue reimplantado mediante anastomosis bronquial con sutura continua de polipropileno 4/0 y sutura arterial continua con polipropileno 5/0.

Para la anastomosis de la vena pulmonar caudal, primeramente se pinzó parcialmente la orejuela de la aurícula izquierda, y se realizó un corte de tamaño similar al calibre del pedículo venoso. Se procedió, tras esto, a la anastomosis veno-auricular con sutura continua de polipropileno 6/0.

La perfusión del injerto se realizó en primer lugar de forma retrógrada, despinzando la aurícula izquierda. Se colocó de nuevo el tubo endotraqueal en su posición inicial, permitiendo la ventilación bipulmonar. Finalmente, se despinzó la arteria pulmonar, manteniendo la perfusión durante 30 minutos.

Una vez finalizado el experimento, se procedió a la eutanasia del animal con profundización anestésica, y cardioplejia mediante cloruro potásico.

3.2.3 Diseño Experimental

El experimento se realizó en dos grupos diferentes. Grupo control (n=7) y Grupo Precondicionamiento Isquémico (PI) (n=7).

En el Grupo Control se siguió la intervención tal cual ha sido descrita previamente.

En el Grupo PI, se pinzó la arteria pulmonar izquierda durante dos periodos de cinco minutos, intercalando cinco minutos de perfusión entre ellos. Esta maniobra se realizó justo antes de la sección bronquial y la oclusión definitiva de la arteria pulmonar, que precedía a su sección y posterior neumonectomía.

3.2.4 Mediciones y recogida de las muestras

Las mediciones y recogida de muestras se realizaron en cinco momentos de la intervención descritos a continuación (figura 17):

- **Basal:** treinta minutos tras la toracotomía y con el animal en ventilación bipulmonar. Se extraen muestras de sangre arterial, para analizar la gasometría arterial y se realiza un estudio hemodinámico.
- **Preneumonectomía (Pre-N):** justo antes de completar la neumonectomía izquierda con el animal bajo ventilación unipulmonar. Se realiza estudio hemodinámico, otra gasometría arterial y se obtiene la primera biopsia de tejido pulmonar (del lóbulo craneal).
- **Pre-reperfusión (Pre-R):** una vez realizadas la anastomosis del lóbulo reimplantado, y antes de la perfusión. Se realiza un estudio hemodinámico, una gasometría arterial y la biopsia de tejido pulmonar (del lóbulo craneal, que se ha conservado en la mesa de cirugía de banco).

- 10 minutos Post-reperfusión (Post-R 10´): tras esperar diez minutos tras la reperfusión, se toman de nuevo medidas hemodinámicas, una muestra de tejido pulmonar (lóbulo caudal) y gasometrías de la arteria femoral, de la arteria pulmonar a través del Swan-Ganz y de la vena pulmonar del lóbulo implantado.
- 30 minutos Post-reperfusión (Post-R 30´): se realizan los mismos estudios que en Post-R 10´.

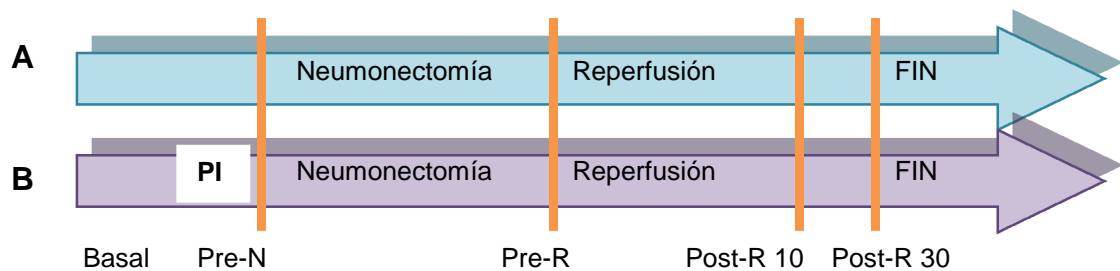


Fig 17: Momentos de la extracción de muestras durante el experimento. A: GC. B: GPI. PI= Precondicionamiento isquémico.

3.2.4.1 Variables Hemodinámicas

Gracias al catéter de la arteria femoral, se analizaron las siguientes variables: Presión Arterial Sistólica (PAS), Diastólica (PAD) y la media (PAM).

Mediante el catéter Swan-Ganz se midieron la Presión Pulmonar Sistólica (PPS), la Diastólica (PPD) y la media (PPM), además de la Presión Capilar Pulmonar (PCP) y la Presión Venosa Central (PVC).

Empleamos un monitor de gasto cardiaco (Edwards Lifesciences, Irving, California), que mediante el método de termodilución nos permite analizar el Índice cardiaco (IC) y el Volumen Sistólico (VS). La termodilución consiste en administrar diez ml de suero salino a 0° por el catéter venoso central, y que el monitor calcule la diferencia de temperatura entre dos puntos, calculando así diferentes parámetros hemodinámicos.

3.2.4.2 **Variables Gasométricas**

Se obtuvieron valores de Presión Arterial de Oxígeno (PaO₂), Presión Arterial de Carbónico (PaCO₂) y de pH sanguíneo analizando las muestras de sangre en los momentos expuestos anteriormente.

Además, obtuvimos valores directamente extraídos de la vena pulmonar del lóbulo reimplantado a los 10 y 30 minutos después de la reperfusión, valores que nos indican directamente la capacidad de intercambio gaseoso de dicho lóbulo.

3.2.4.3 **Variables Bioquímicas del Tejido Pulmonar:** Las dos primeras muestras de tejido pulmonar en el experimento (Pre-N y Pre-R) se obtuvieron del lóbulo craneal del pulmón izquierdo (en la Pre-R se toma una muestra del lóbulo craneal sobre la mesa de cirugía de banco, justo antes de reperfundir el lóbulo caudal ya reimplantado).

Las dos últimas muestras (Post-R 10 y Post-R 30) fueron tomadas del lóbulo caudal del pulmón izquierdo, que es el reimplantado en todos los casos.

Todas las muestras fueron introducidas en un criotubo, congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas en un congelador a -80°C hasta que fueron procesadas.

3.2.4.3.1 Evaluación del estrés oxidativo: Los lipoperóxidos (LPO) muestran el grado de degradación de la membrana lipídica de las células tras la oxidación. Se determinan utilizando un kit específico (K-assay LPO-CC, Kamiya Biochemical Company, USA). Se basa en la reacción de los LPO con el cromógeno MCDP (10-N-metilcarbamoil-3-7-dimetilamino-10-10-fenotiacina) en una reacción enzimática catalizada por la hemoglobina en la que los LPO son reducidos a derivados hidroxílicos y el MCDP se oxida a azul de metileno en una reacción equimolar. Los LPO son así cuantificados colorimétricamente midiendo la absorbancia de las muestras a 675nm.

El Malondialdehído (MDA) es un compuesto final de la peroxidación lipídica y un marcador de daño celular. Se analiza indirectamente cuantificando la formación de ácidos tiobarbitúricos en tejido pulmonar.

La Mieloperoxidasa (MPO) indica acumulo de polimorfonucleares neutrófilos. Para determinarla, se sigue el método Bradley modificado(98)(98): se trocea la muestra finamente a unos 4°C, se homogeniza mediante la adición de un buffer de fosfato potásico (pH 6.0) y se centrifuga el resultado durante 15 segundos a 20.000g. El sobrenadante resultante se desecha, y al precipitado se le añade buffer de fosfato potásico y 50 mmol/l de bromuro de hexadeciltrimetil amonio, con el fin de descartar la actividad de la pseudoperoxidasa y solubilizar la MPO que está

ligada a membranas celulares. Esta suspensión nueva, se homogeniza de nuevo durante 30 segundos. Posteriormente se desagrega durante 20 segundos. El resultado se congela primero, para descongelarlo a continuación. Finalmente, se mezclan 100 microlitros de sobrenadante con 2.9 ml de buffer fosfato potásico (50mmol/l y pH 6.0) y 0.167 mg/ml de dihidroclorhidrato de O-dianisidina además de 0.0005% de peróxido de hidrógeno. Se introduce la mezcla en el espectofotómetro de Beckam durante 2 minutos y se mide la absorbancia a 460nm. La unidad de actividad de la MPO se define como la actividad necesaria para degradar 1 micromol de peróxido de hidrógeno por minuto a 25°C.

3.2.4.3.2 Expresión de mediadores inflamatorios: MCP-1 (ELISA y RT-PCR), TNF- α , IL-1 (Western Blot y RT-PCR), IL-10 (RT-PCR) y NFkB, I κ B, I κ B-P (Western Blot).

- Análisis ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay): los niveles de MCP-1 fueron determinados usando un kit específico (Biosource International) mediante la homogeneización del tejido pulmonar.
- Análisis Western Blot: la expresión de proteínas inflamatorias (TNF- α , IL-1, NFkB, I κ B, I κ B-P) se determinó por Western Blot. Consiste en la utilización de anticuerpos específicos, monoclonal anti-human TNF- α (Endogen), monoclonal anti-IL1 (Bio Génesis) y monoclonal anti NFkB, I κ B o I κ B-P. Éstos se unen a dichas proteínas y permiten a través de los marcadores luminiscentes, cuantificarlas. Las muestras se homogeneizaron en tampón de lisis (199mmol/L NaCl, 10mmol/L TRIS-Cl pH7.6, 1mmol/L EDTA pH8.0, 1 μ g/ml aprotinina,

100µg/ml PMSF). Todas las muestras se diluyeron (1:1) con tampón 2X (100mmol/L TRIS-HCl pH6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0.1 azul de bromofenol, 200mmol/L ditioneitol y se hirvieron 10 minutos a 100°C. Para corregir posibles variaciones en el tamaño de las muestras se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Cantidades equivalentes de proteína se sometieron a electroforesis en gel de SDS poliacrilamida (10%). Una vez separadas las proteínas, eran transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) a la que quedan unidas irreversiblemente y donde son más accesibles a los anticuerpos específicos. A continuación las membranas se incubaron 90 minutos a 37°C en un buffer (20mmol/L TRIS, 150 mmol/L NaCl, 0,2% Nonidet P 40, 5% leche desnatada) para bloquear la unión inespecífica, y después se incubaron 60 minutos a 20°C en presencia de anticuerpos primarios específicos. Tras un lavado para eliminar el anticuerpo no unido, las membranas se incubaron de nuevo durante 60 minutos a 20°C en presencia de un anticuerpo secundario que reconoce inmunoglobulinas de conejo, acoplado covalentemente a una peroxidasa (horseradish peroxidase-conjugated polyclonal anti-rabbit IgG secondary antibody, Transduction Lab, Lexington, KY).

Después de lavar con T-TBS las membranas fueron incubadas con reactantes de detección ECL Plus (Amersham Life Science Inc., Buckinghamshire, UK) y expuestas a una película de rayos X. Las películas fueron escaneadas con un densitómetro (BioRad GS 800)

para determinar sus densidades ópticas relativas. Marcadores proteicos marcados previamente fueron usados para las determinaciones del peso molecular. La reproducibilidad dentro de los ensayos fue evaluada con tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó con tres replicados. El coeficiente de variación intra-ensayo fue menor de 5%. El coeficiente de variación inter-ensayo fue menor de 6%.

- Expresión de mRNA. Se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (reverse transcription-polymerase chain reaction RT-PCR): el RNA fue aislado usando el método descrito por Chomczynski (99) utilizando el TRI Reagent Kit (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA). Inmediatamente después de obtener la muestra, el tejido fue homogeneizado con 1ml de solución D (0.36 ml 2-mercaptoethanol/50ml de una solución patrón) y recogido en un tubo de polipropileno. Se añade 0.1ml de 2-M-acetato de sodio, pH4, 1ml de fenol, y 0.2 ml de una mezcla de cloroformo-isoamil alcohol (49:1). La suspensión final fue agitada y enfriada en hielo durante 15 minutos. Posteriormente fue centrifugada durante 20 minutos, quedando presente el RNA en la fase acuosa. Esta fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo, con 1ml de isopropanol, y después congelada a -20°C durante 1 hora para precipitar el RNA. Se realiza de nuevo una centrifugación, durante 20 minutos y el sedimento de RNA se disuelve en 0.3 ml de solución D en un tubo Eppendorf. Después de una nueva centrifugación de 10 minutos de este tubo

Eppendorf, el sedimento de RNA es resuspendido en 75% de etanol, sedimentado, deshidratado y disuelto de nuevo en 50µl 0.5% SDS a 65°C durante 10 minutos. En este punto la preparación de RNA puede ser utilizada para la cromatografía en un gel 1.5% agarosa de electroforesis, y medir sus concentraciones por espectrofotometría.

La transcripción inversa de 2mg de RNA para síntesis de cDNA fue realizada usando el Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) y un pd(N)6 hexámero al azar. La RT-PCR fue realizada usando un aparato de Applied Biosystems 7300. Las secuencias de las transcripciones fueron:

- MCP-1= ACAGAAGAGTCACCAGCAGCAA
- MPC-1 inversa= GCCCGCGATGGTCTT
- IL-1= TGTGATGAAAGACGGCACAC
- IL-1 inversa= CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG
- IL-10= ACTGCACCCACTTCCCAGT
- IL-10 inversa= TTGTCCAGCTGGTCCTTTGT
- TNF-α= ATGAGAAGTTCCCAAATGGC
- TNF-α inversa= CTCCACTTGGTGGTTTGCTA

Cambios relativos en la expresión genética fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (100).

3.2.4.4 Estudio histológico de tejido pulmonar Las muestras para el análisis histológico del tejido pulmonar se obtienen al mismo tiempo que las obtenidas para determinación de las variables bioquímicas en tejido. Las dos primeras muestras de tejido pulmonar en el experimento (Pre-N y Pre-R) se obtuvieron del lóbulo craneal del pulmón izquierdo. Las dos últimas muestras (Post-R 10 y Post-R 30) fueron tomadas del lóbulo caudal del pulmón izquierdo, que es el reimplantado.

Inmediatamente después de su obtención, las muestras se fijan en una solución de formaldehído tamponado al 10% durante 24h. Después de su inclusión en parafina en cassetes identificados, se realizan secciones de 3µm y se montan en portas bañados en xilano, incubándose durante 12 h a 60°C. Se desparafinan con xileno y se rehidratan utilizando alcoholes de graduación sucesiva durante 5 minutos, tras lo cual se lavan con agua destilada 5 minutos.

Posteriormente, se tiñen con hematoxilina-eosina mediante el método de Harris. Brevemente, los portas se colocan en cestillos que se introducen durante 8 o 15 minutos en la solución de Harris y se lava el exceso de hematoxilina con agua; se diferencian con una mezcla de ácido hidroclorehídrico al 1% y etanol 70% durante 5 o 10 segundos y se aclaran con agua; se azulean las preparaciones lavándolas durante 30 o 90 segundos con agua; se introducen entre 15 segundos y 3 minutos en la solución de eosina; se deshidratan en etanol al 95% y de 100%; y, finalmente, se introducen en xileno y se montan.

Las muestras se observan mediante microscopía óptica valorando parámetros de daño pulmonar mediante una sistema de puntuación semi-cuantitativo (0-inexistente; 1-leve; 2-moderado; 3-severo). Los parámetros analizados fueron:

- a. Infiltración por monocito-macrófagos del intersticio tisular.
- b. Infiltración por neutrófilos del intersticio tisular.
- c. Edema: valorando el engrosamiento peribronquial y de los septos interalveolares (figura 18 y 19).

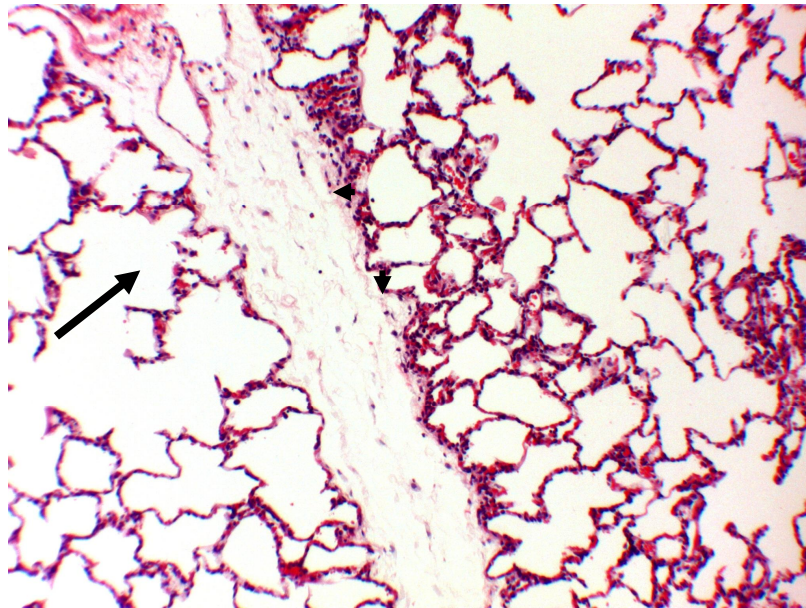


Fig 18: Parénquima pulmonar normal, con edema septal (flecha) y congestión capilar leve (puntas de flecha)

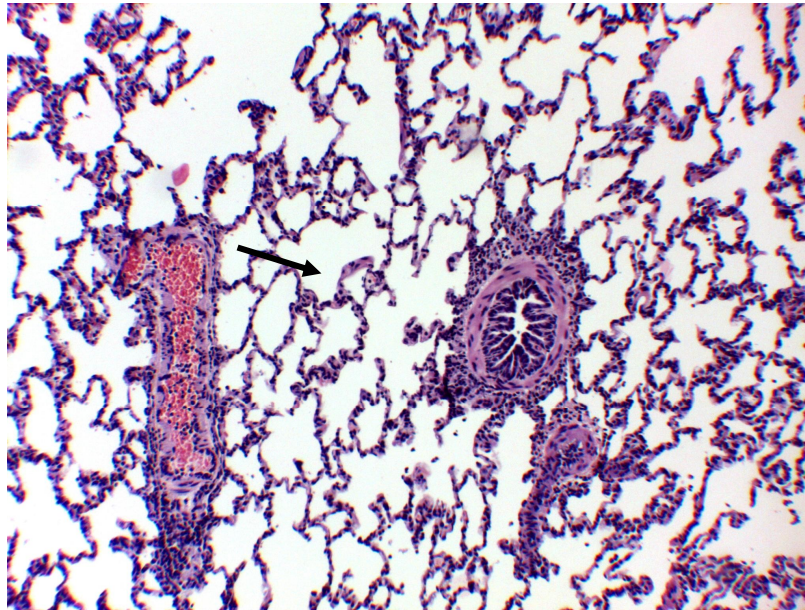


Fig 19: Pulmón con inflamación crónica intersticial moderada, de predominio peribronquiolar (flecha)

3.2.5 Análisis estadístico

Con todos los datos clínicos y de laboratorio registrados se confeccionó una base de datos con el programa SPSS 15.= para Windows. Los resultados se expresan como la media y el error estándar. Para el análisis de diferencias entre grupos se ha empleado el test estadístico no paramétrico de la U de Mann-Whitney para muestras independientes. La prueba de Wilcoxon se usó para estudiar la evolución de valores intragrupo. La significación estadística empleada fue $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 DATOS DEMOGRÁFICOS Y TIEMPOS QUIRÚRGICOS

En el estudio realizado, no se observaron diferencias entre los grupos Control y Precondicionamiento Isquémico (PI) en relación al peso, tiempo de isquemia pulmonar, ventilación unipulmonar o duración del procedimiento (Tabla 6).

Tabla 6. Variables demográficas y tiempos quirúrgicos.

Variables	Grupos	Valores
Peso	Control	42±6
(Kg)	PI	35±3
Tiempo de isquemia	Control	102±8
(minutos)	PI	107±7
Ventilación unipulmonar	Control	117±4
(minutos)	PI	114±4
Duración del procedimiento	Control	285±15
(minutos)	PI	314±7

Datos expresados como media ± error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico.

4.2 RESULTADOS HEMODINÁMICOS

En cuanto a las variables hemodinámicas, a continuación se exponen los diferentes datos referentes a la frecuencia cardiaca, Presión arterial media, Presión media de la Arteria Pulmonar, Índice Sistólico e Índice Cardíaco (Tabla 7).

Tabla 7. Variables Hemodinámicas.

Variables Hemodinámicas	Grupos	Basal	Pre-N	Pre-R	Post-R 10´	Post-R 30´
FC (lpm)	Control	100±9	92±10	102±10	99±9	96±10
	PI	100±6	108±10	108±11	114±14	125±13
PAM (mmHg)	Control	99±5	98±5	88±6	88±5	83±6
	PI	93±2	105±4	95±6	85±3	83±7
PAPM (mmHg)	Control	25±2	23±2	24±2	28±4	28±3
	PI	20±1	30±1*	33±7	30±2	28±3
IS (ml/latido)	Control	51±6	53±6	47±5	51±5	52±6
	PI	61±9	51±4	48±7	43±6	40±7
IC (L x min ⁻¹ x m ⁻²)	Control	5.2±0.6	4.5±0.3	4.7±0.5	4.9±0.7	6.2±1.5
	PI	6.6±0.8	5.9±0.4	5.2±0.5	7.1±2.5	6.9±1.1

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. FC: Frecuencia cardiaca; PAM: Presión Arterial Media; PAPM: Presión media de la Arteria Pulmonar; IS: Índice sistólico; IC: Índice Cardíaco; lpm: latidos por minuto; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10´: Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30´: Post-reperusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control.

Analizando los valores de la Frecuencia Cardiaca, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, aunque se observan levemente aumentados en la fase Post-R 30´ en el grupo PI (figura 20).

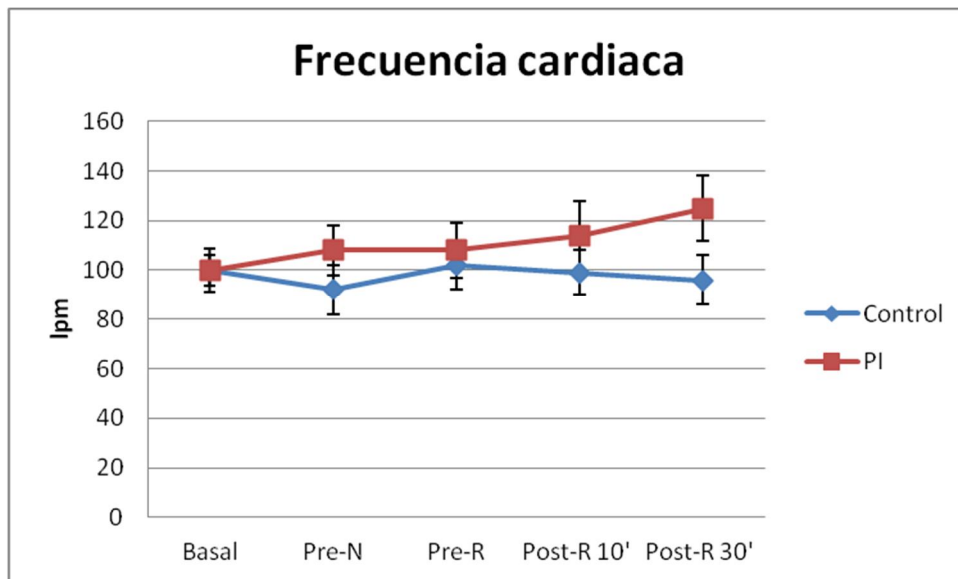


Fig 20: Valores de la frecuencia cardiaca. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. FC: Frecuencia cardiaca; lpm: latidos por minuto; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control.

En relación a la Presión Arterial Media, se observa un ligero ascenso en el grupo PI en el momento previo a la neumonectomía, volviendo posteriormente a la normalidad, y sin ninguna diferencia estadísticamente significativa (figura 21).

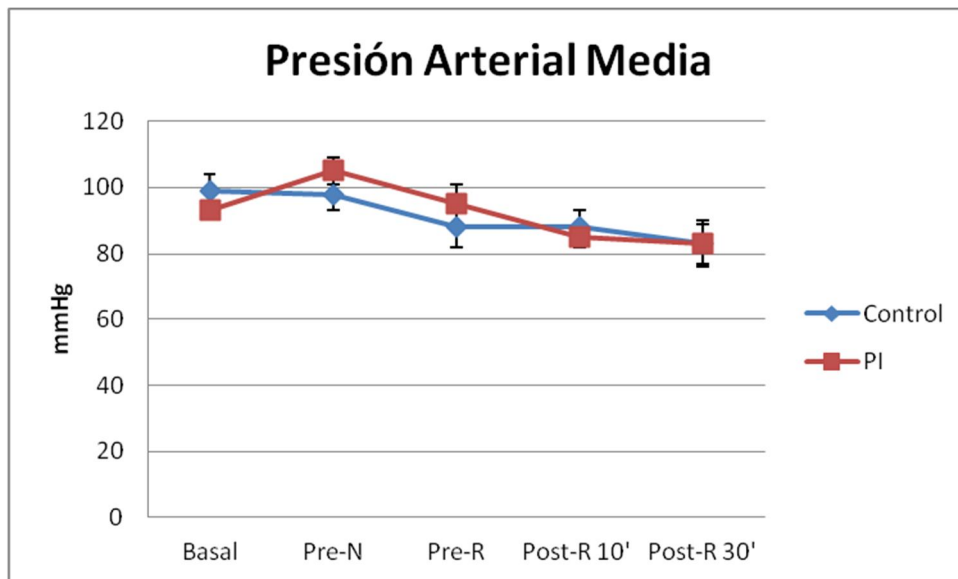


Fig 21: Valores de Presión Arterial Media. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. PAM: Presión Arterial Media; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control.

En cambio, sí observamos variaciones en la Presión media de la Arteria Pulmonar en las fases Pre-N y Pre-R, siendo más elevadas en el grupo PI, y con una diferencia en este grupo, en el momento previo a ser completada la neumonectomía (figura 22).

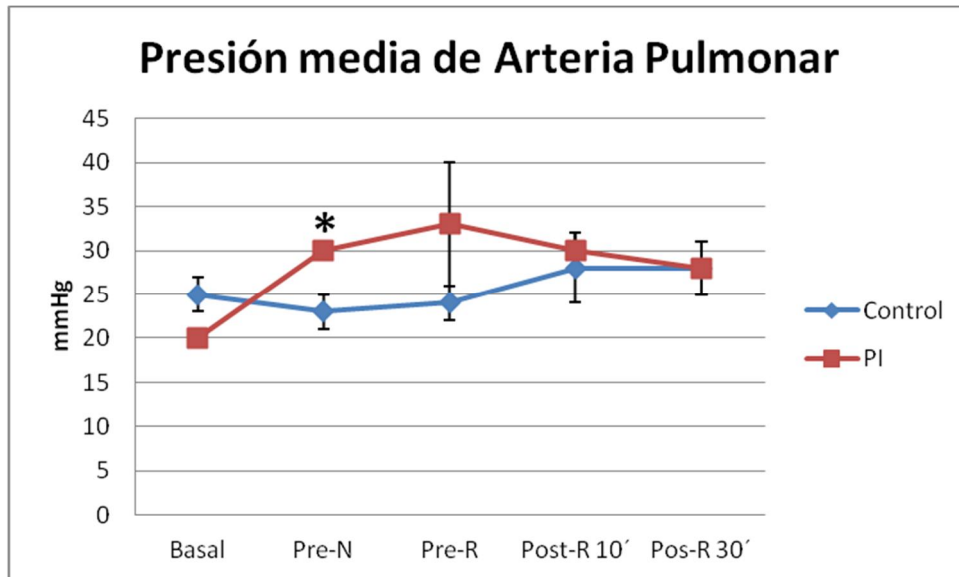


Fig 22: Valores de la Presión de Arteria Pulmonar Media (mmHg). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. PAMP: Presión Arteria Pulmonar Media; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control.

En los valores del Índice Sistólico, se observó una ligera tendencia a disminuir después de la reperusión en el grupo PI, pero sin obtener diferencias significativas (figura 23).

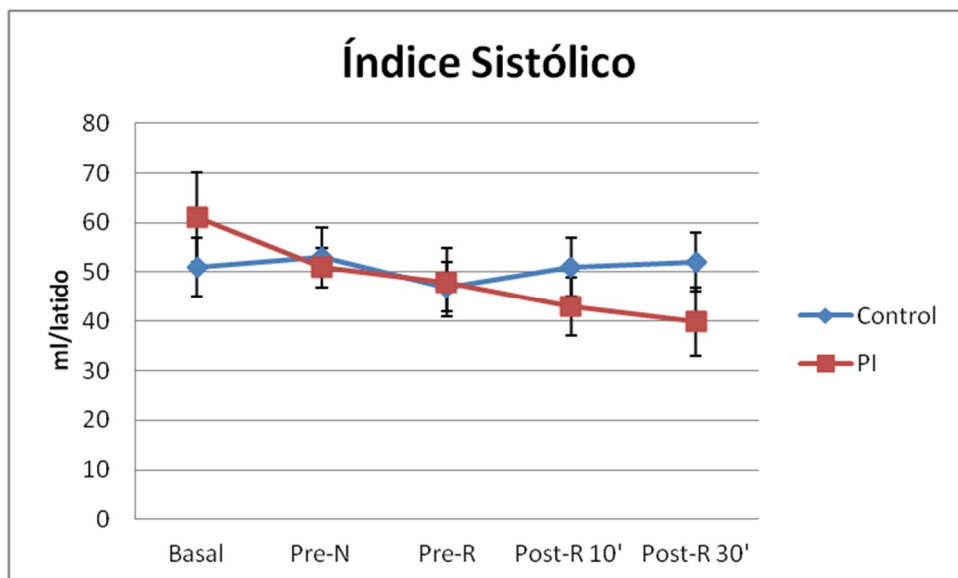


Fig 23: Valores del Índice Sistólico (ml/latido). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. IS: Índice sistólico. Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control.

Finalmente, en cuanto al Índice Cardíaco, tampoco fueron demostradas diferencias entre ambos grupos (figura 24).

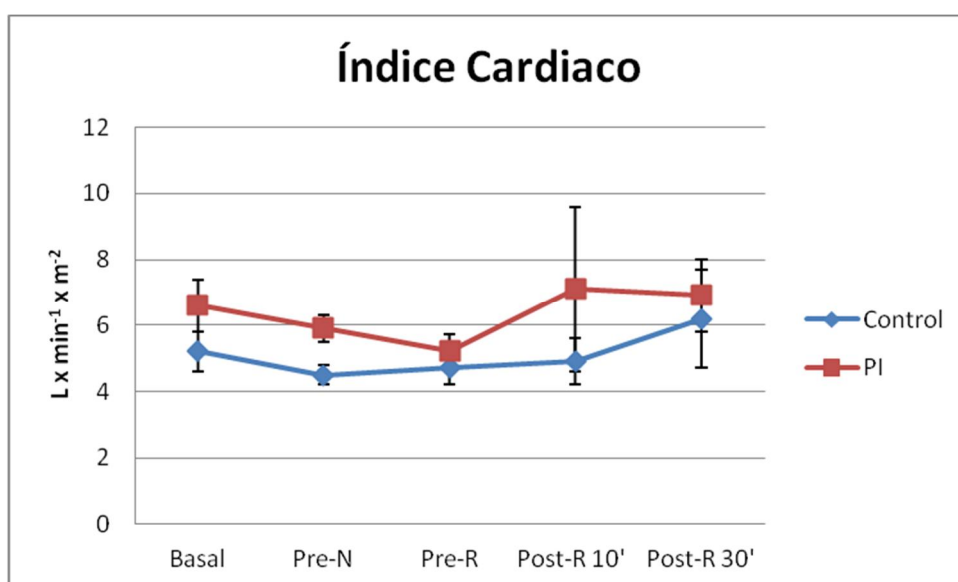


Fig 24: Valores de Índice Cardíaco ($L \times min^{-1} \times m^2$). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. IC: Índice Cardíaco. Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control.

4.3 RESULTADOS GASOMÉTRICOS

En la siguiente tabla (Tabla 8) observamos los niveles de PaO₂ durante las diferentes fases del experimento. Comparando los resultados de sangre periférica, extraída desde la arteria femoral, y la muestra obtenida directamente desde la vena pulmonar inferior después del implante, se observará una diferencia únicamente en este último grupo a los 30' post-R.

Tabla 8. Variables Gasométricas. Presión arterial de oxígeno.

Variables		Grupos	Basal	Pre-N	Pre-R	Post-R	Post-R
Gasométricas						10'	30'
PaO ₂ arteria femoral (mmHg)		Control	356±49	200±31	303±45	246±49	302±53
		PI	331±60	288±63	391±42	315±61	323±60
PaO ₂ vena pulmonar (mmHg)		Control				279±65	253±39
		PI				225±65	446±39*

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. PaO₂: Presión parcial de oxígeno. Pre-N: Pre-neumonecromía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control.

En la siguiente gráfica (figura 25) se observan un leve aumento de los niveles de PaO₂ en el grupo PI, pero sin diferencias significativas.

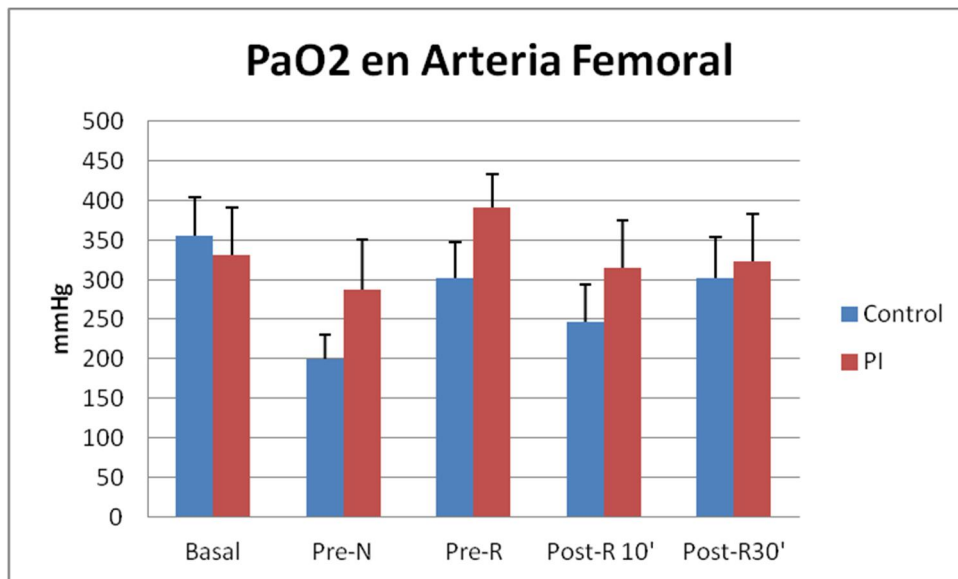


Fig 25: Valores de PaO₂ extraída de la Arteria Femoral. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. PaO₂: Presión parcial de oxígeno. Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control.

En cambio, cuando se hizo el estudio gasométrico de sangre extraída directamente de la vena pulmonar del lóbulo reimplantado, a los 10' y 30' de la reperusión, se demostró una diferencia a favor del grupo PI (figura 26).

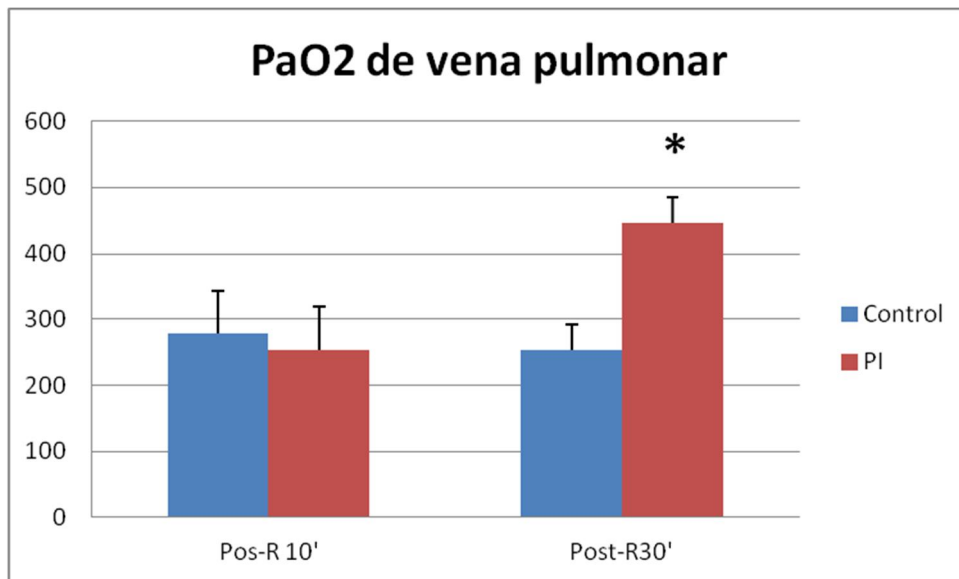


Fig 26: Valores de PaO₂ en sangre extraída de vena pulmonar de lóbulo implantado. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. PaO₂: Presión parcial de oxígeno. Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control.

4.4 VARIABLES BIOQUÍMICAS

A continuación se exponen los diferentes resultados de variables del estrés oxidativo y mediadores inflamatorios, a partir de muestras de tejido pulmonar tomadas en diferentes momentos del experimento, a partir de la Pre-N.

4.4.1 Estrés oxidativo

Tabla 9. Variables del estrés oxidativo

Estrés oxidativo	Grupos	Pre-N	Pre-R	Post-R 10'	Post-R 30'
LPO (Mmol/mg prot)	Control	2.8±0.09	3.54±0.09 [‡]	3.5±0.2 [‡]	3.89±0.07 [‡]
	PI	2.63±0.04	2.8±0.1 [*]	2.86±0.08 ^{*‡}	3.11±0.02 ^{*‡¥}
MDA (Pmol/mg prot)	Control	3.25±0.2	3.86±0.1 [‡]	4.93±0.1 ^{‡¥}	5.25±0.08 ^{‡¥}
	PI	3.46±0.2	4.33±0.11 ^{*‡}	4.35±0.12 [‡]	4.72±0.07 ^{‡¥}
MPO (UI/mg prot)	Control	0.06±0.006	0.09±0.002	0.17±0.01 [‡]	0.22±0.006 [‡]
	PI	0.06±0.014	0.01±0.014	0.08±0.014 [*]	0.14±0.008 [*]

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. LPO: Lipoperoxido; MDA: Malondialdehído; MPO: Mieloperoxidasa. Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control. ‡ P<0.05 vs Pre-N. ¥ P<0.05 vs Pre-R.

En el caso de la LPO, se observa unos niveles menores ya desde la Pre-R, con diferencia significativa en el grupo PI respecto al grupo control (figura 27).

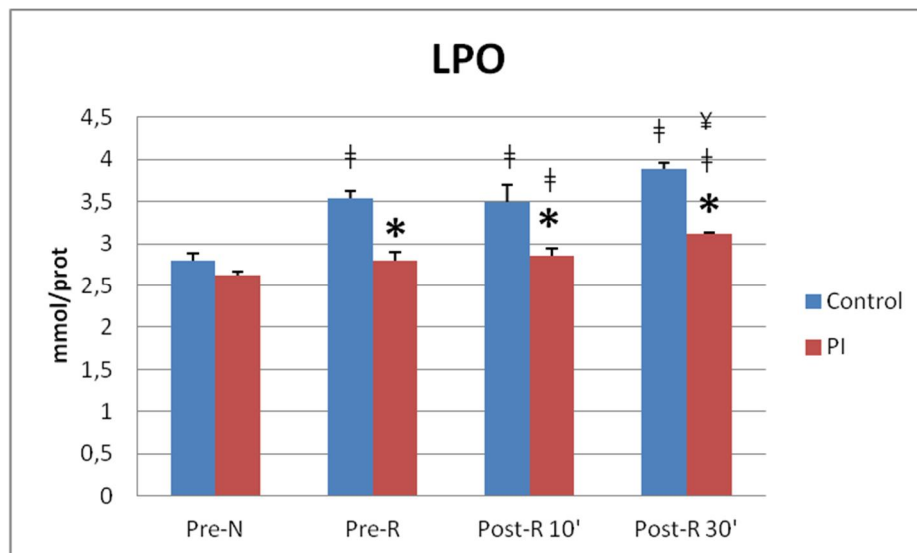


Fig 27: Mediciones de Lipoperoxidos (LPO). Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. LPO: Lipoperoxidos; . Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control. ‡ P< 0.05 vs Pre-N. ¥ P<0.05 vs Pre-R.

En cambio, en las mediciones del Malonilaldehído, se observa un significativo aumento de sus niveles en el grupo PI, justo antes de la reperfusión (Pre-R), sin embargo, éstos disminuirán progresivamente en las fases posteriores, por debajo del grupo control, aunque ya sin diferencias estadísticamente significativas(figura 28).

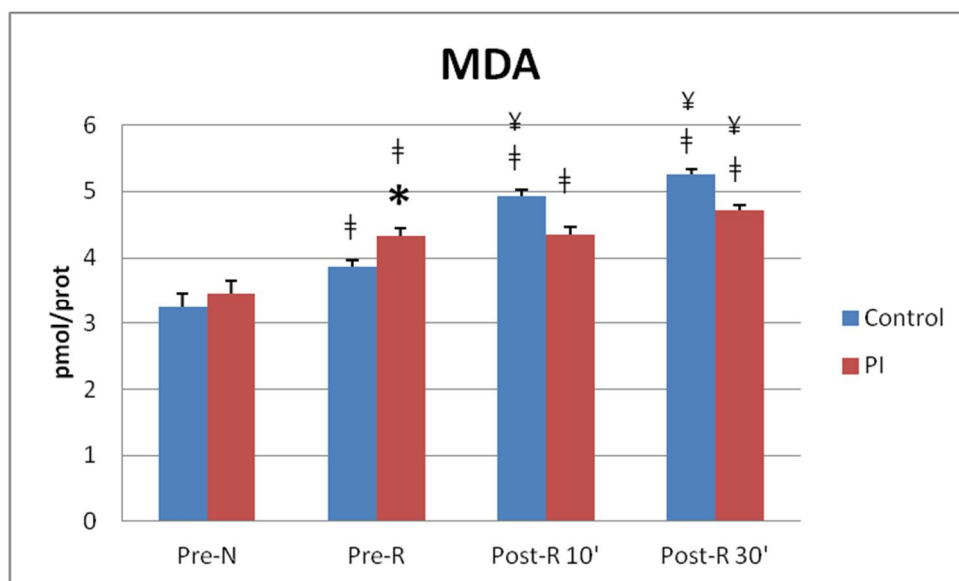


Fig 28: Valores de Malonilaldehído (MDA). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. MDA: Malondialdehído; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control. † $P < 0.05$ vs Pre-N. ‡ $P < 0.05$ vs Pre-R.

Finalmente, comparando los valores de Mieloperoxidasa, se demuestra una disminución significativamente estadística, a partir de la reperfusión, en el grupo PI. Dentro del grupo control, se observa un aumento significativo de sus niveles comparando con el momento Pre-N (figura 29).

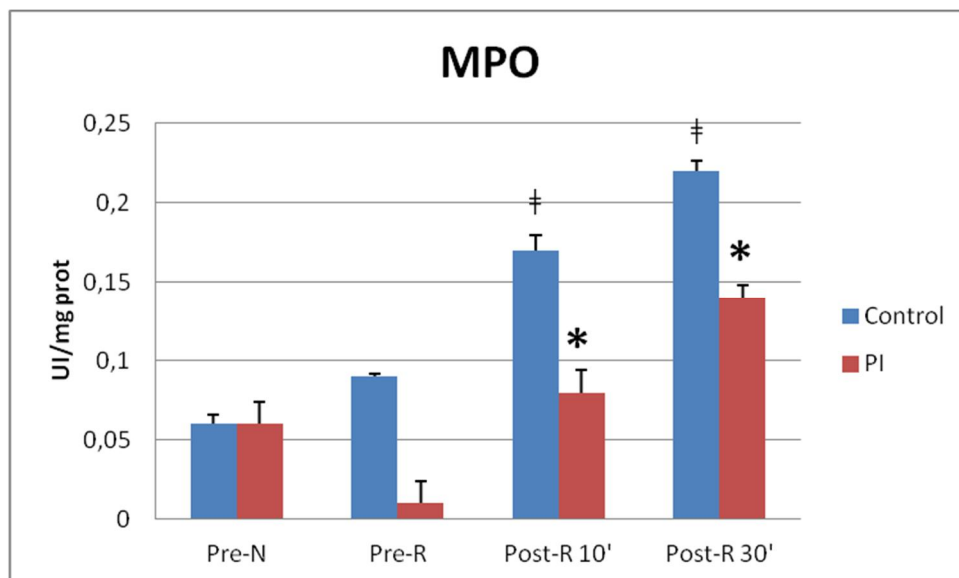


Fig 29: Valores de Mieloperoxidasa (MPO). MPO: Mieloperoxidasa. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. Pre-N: Pre-neumonecromía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control. † $P < 0.05$ vs Pre-N. ‡ $P < 0.05$ vs Pre-R.

4.4.2 Mediadores Inflamatorios: Citoquinas y Quimioquinas

A continuación se comparan los resultados que obtuvimos estudiando la expresión de las citoquinas IL1 y TNF- α y de sus respectivos mRNA mediante las técnicas de Western Blot y RT-PCR respectivamente. Se muestra también la expresión de mRNA IL10 mediante RT-PCR (tabla 10).

Tabla 10: Valores de las Citoquinas

Citoquinas	Grupos	Pre-N	Pre-R	Post-R 10'	Post-R30'
IL-1 (unidades arbitrarias)	Control	1.25±0.01	1.82±0.05 [‡]	1.65±0.1 [‡]	1.81±0.02 [‡]
	PI	1.42±0.02*	1.46±0.12*	1.24±0.14*	1.34±0.03*
TNF-α (unidades arbitrarias)	Control	0.83±0.08	0.81±0.06 [‡]	0.85±0.04 ^{‡¥}	1.2±0.03 ^{‡¥}
	PI	0.84±0.03	0.67±0.05*	0.66±0.02 ^{**‡}	0.74±0.01*
mRNA	Control	1.14±0.29	2.05±0.45 [‡]	2.3±0.41 ^{‡¥}	2.41±0.25 ^{‡¥}
IL-1 (unidades arbitrarias)	PI	0.84±0.41	0.91±0.32*	0.46±0.2*	0.51±0.2*
mRNA	Control	0.92±0.36	9.31±3.02 [‡]	29.56±4.57 [‡]	27.54±3.6 [‡]
TNF-α (unidades arbitrarias)	PI	2.7±1.41	3.97±2.24*	1.52±0.17*	2.99±0.24*
mRNA	Control	1.72±0.19	1.81±0.19	1.77±0.07	1.07±0.14 ^{‡¥§}
IL-10 (unidades arbitrarias)	PI	1.61±0.20	1.58±0.08	1.66±0.06	1.06±0.03 ^{‡¥§}

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. IL-1: Interleuquina 1; TNF-α: Factor de necrosis tumoral; IL-10: Interleuquina 10; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control. ‡ P<0.05 vs Pre-N. ¥ P<0.05 vs Pre-R. § P<0.05 vs Post-R 10'.

La IL-1, tanto en Western Blot, como en RT-PCR, ha demostrado una diferencia a partir de la reperfusión, con expresiones menores en el grupo PI respecto al grupo control. Además, comparando dentro del grupo control, su expresión a partir de la Pre-N, mantendrá diferencias significativas aumentadas durante el resto del experimento (figura 30 y figura 31).

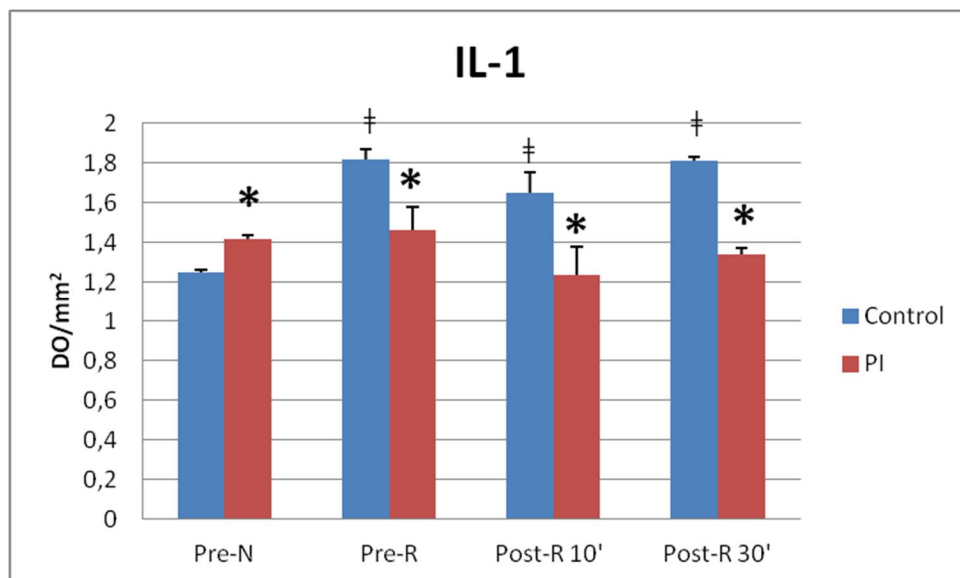


Fig 30: Resultados de IL-1 (Western Blot). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. IL-1: Interleuquina 1; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control. ‡ $P < 0.05$ vs Pre-N.

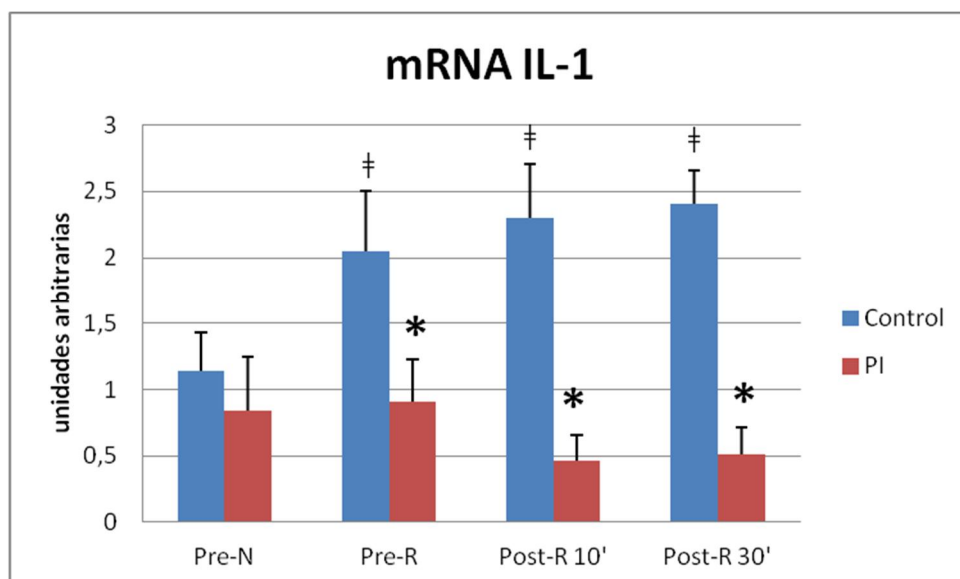


Fig 31: Resultados de mRNA IL-1 (RT-PCR). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. IL-1: Interleuquina 1; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control. ‡ $P < 0.05$ vs Pre-N.

De la misma forma, comparando la expresión de TNF- α en Western Blot y de su mRNA en RT-PCR, en ambos se observa disminuida en el grupo PI, desde el momento de la reperusión con diferencia significativa. Del mismo modo que anteriormente, la expresión de TNF α y de su mRNA, dentro del grupo control, presentará un progresivo ascenso desde la Pre-N, con diferencia significativa (figura 32 y figura 33).

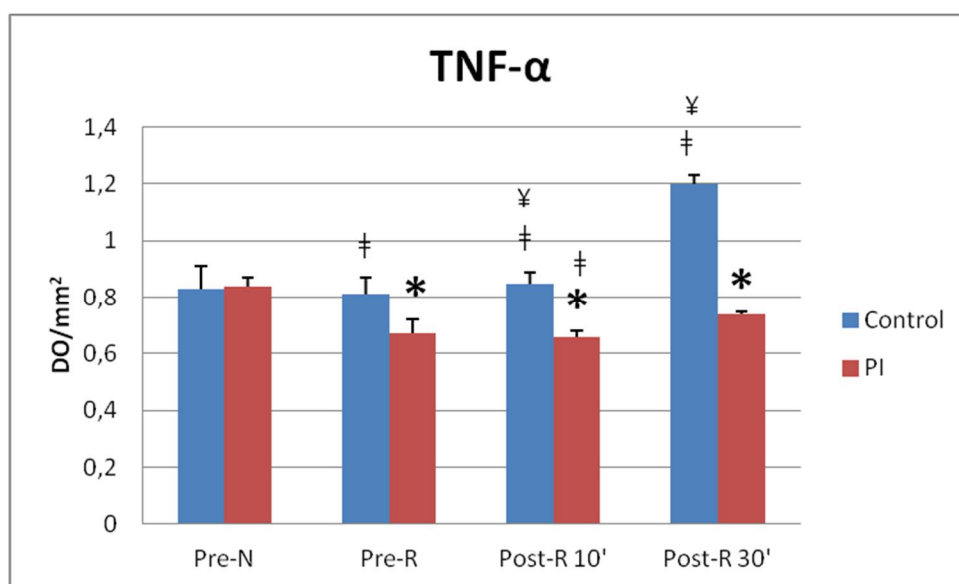


Fig 32: Valores de TNF- α (Western Blot). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media.; PI: Precondicionamiento isquémico. TNF- α : Factor de necrosis tumoral; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control. † P<0.05 vs Pre-N. ‡ P<0.05 vs Pre-R

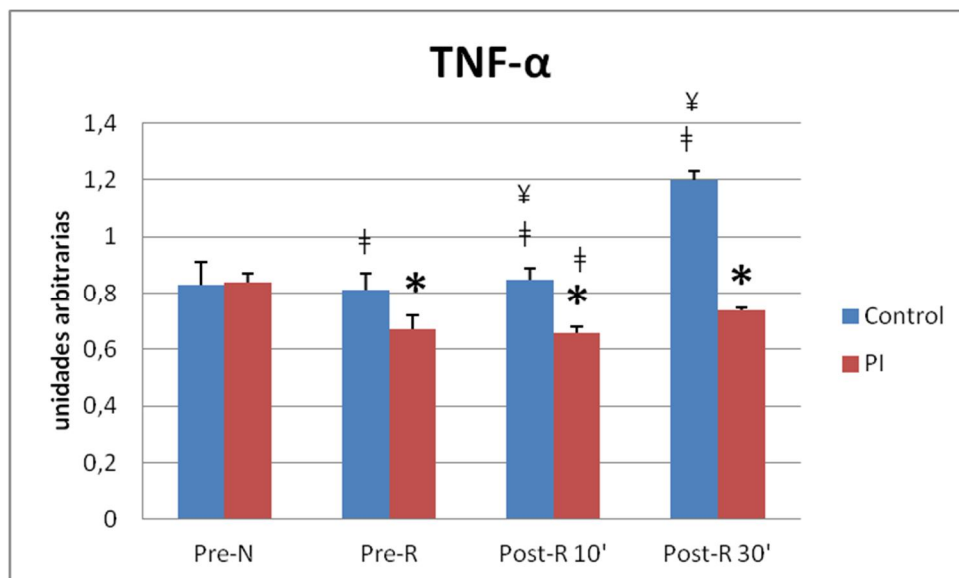


Figura 33: Valores de mRNA TNF- α (RT-PCR). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media; PI: Precondicionamiento isquémico. TNF- α : Factor de necrosis tumoral; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control. † P<0.05 vs Pre-N. ¥ P<0.05 vs Pre-R

En relación a la Interleuquina 10 (IL10), no se observaron cambios entre el grupo control y PI durante el experimento. No obstante, en la Post-R 30', se observa tanto en el grupo control como en el PI, un descenso de la expresión de su mRNA, con significación estadística, respecto al momento Pre-N, Pre-R y Post-R 10' respectivamente (figura 34).

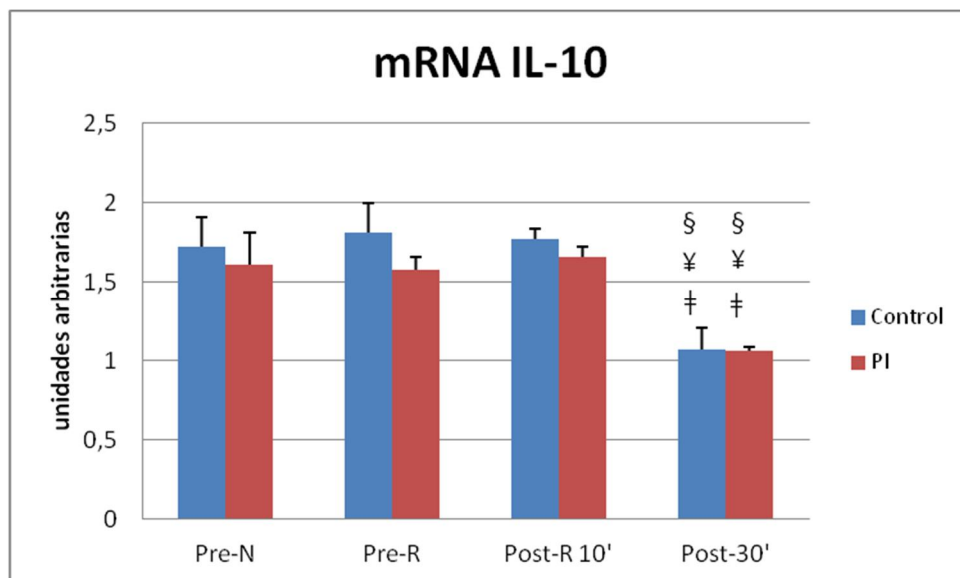


Fig 34: Valores de mRNA IL-10 (RT-PCR). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media; PI: Precondicionamiento isquémico. IL-10: Interleuquina 10; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control. † $P < 0.05$ vs Pre-N. ‡ $P < 0.05$ vs Pre-R. § $P < 0.05$ vs Post-R 10'.

Dentro del apartado de las quimioquinas, observamos la concentración de MCP-1 estudiada mediante técnica ELISA y la expresión de su mRNA mediante RT-PCR en la siguiente tabla (Tabla 11).

Tabla 11: Valores de MCP-1

MCP-1	Grupos	Pre-N	Pre-R	Post-R 10'	Post-R 30'
MCP-1 ELISA (pg/mg proteína)	Control	0.21±0.05	0.59±0.1 [‡]	0.47±0.01 ^{‡¥}	0.56±0.01 ^{‡¥§}
	PI	0.16±0.05	0.15±0.02 [*]	0.13±0.01 [*]	0.27±0.01 [*]
MCP-1 mRNA (unidades arbitrarias)	Control	0.8±0.36	3.53±0.45 [‡]	2.86±0.32 [‡]	2.97±0.23 [‡]
	PI	0.6±0.32	1.51±0.12 [*]	0.61±0.36 [*]	0.83±0.12 [*]

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. MCP-1: proteína quimiotáctica del monocito -1.; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control. ‡ P<0.05 vs Pre-N. ¥ P<0.05 vs Pre-R. § P< 0.05 vs Post-R 10'.

En las siguientes gráficas podemos ver comparados las concentraciones de MCP-1 (ELISA) y la expresión de su mRNA (RT-PCR). En ambas se observa una diferencia entre el grupo control y PI, con niveles marcadamente mayores de esta quimioquina en el grupo control. Además, dentro del grupo control, se demostró unas concentraciones y expresión mayores en comparación con los estadíos más iniciales del experimento como son la Pre-N, Pre-R y post-R 10' (figura 35 y figura 36).

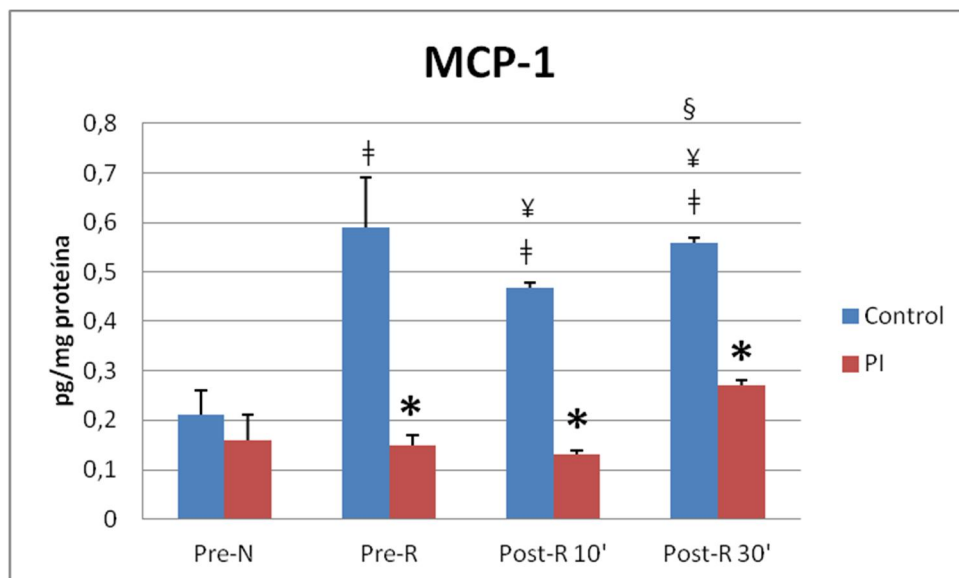


Fig 35: Valores de MCP-1 (ELISA) Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. MCP-1: proteína quimiotáctica del monocito -1.; PI: Precondicionamiento isquémico. Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control. ‡ $P < 0.05$ vs Pre-N. § $P < 0.05$ vs Post-R 10'

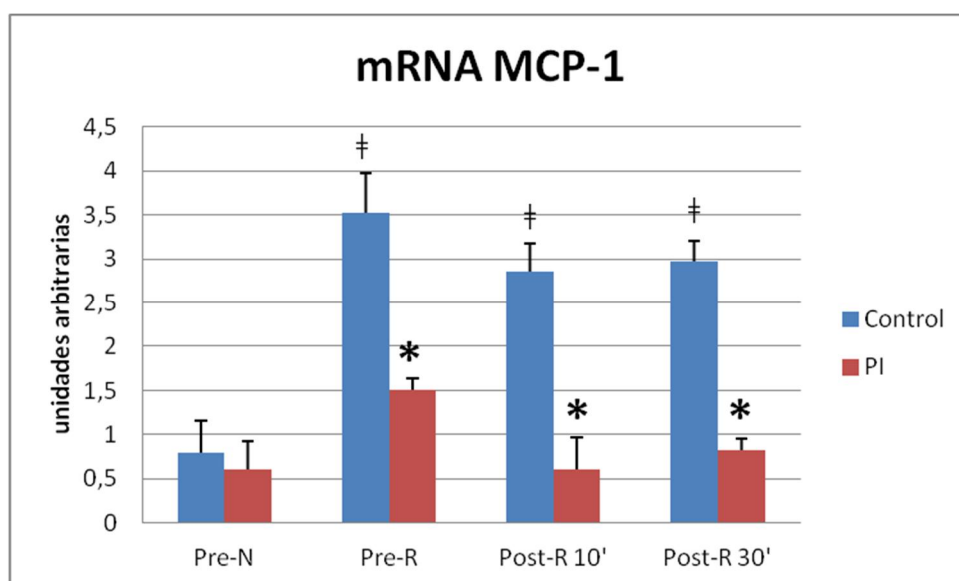


Figura 36: Valores de mRNA MCP-1 (RT-PCR) Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. MCP-1: proteína quimiotáctica del monocito -1.; PI: Precondicionamiento isquémico. Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control. ‡ $P < 0.05$ vs Pre-N.

4.4.3 Factores de Transcripción:

Por último, exponemos los resultados obtenidos tras estudiar la expresión de los factores de transcripción NFkB(en sus diferentes subunidades), IKB y IKB-p mediante Western Blot, en la siguiente tabla (tabla 12).

Tabla 12: Valores de los factores de transcripción.

Factores de Transcripción	Grupos	Pre-N	Pre-R	Post-R 10'	Post-R 30'
NFkB citosol (DO/mm ²)	Control	1,4±0,036	1,13±0,02 [‡]	0,87±0,04 [‡]	0,62±0,035 ^{‡¥§}
	PI	1,42±0,1	1,29±0,06 [*]	1,13±0,01 ^{**}	0,9±0,099 ^{**¥}
NFkB nucleo (DO/mm ²)	Control	0,89±0,05	1,68±0,088 [‡]	1,6±0,09 [‡]	1,5±0,029 ^{‡¥}
	PI	0,88±0,015	1,07±0,05 ^{**}	1,12±0,05 ^{**}	1,2±0,056 ^{**}
NFkB citosol (DO/mm ²)	Control	0,06±0,064	0,64±0,077	0,66±0,078	0,62±0,051
	PI	0,56±0,12	0,59±0,079	0,522±0,071	0,524±0,062
NFkB nucleo (DO/mm ²)	Control	0,48±0,042	0,577±0,088	0,578±0,048	0,576±0,058
	PI	0,472±0,035	0,497±0,0557	0,545±0,118	0,534±0,091
NFkB citosol (DO/mm ²)	Control	0,896±0,079	0,747±0,047	0,777±0,076	0,469±0,03 ^{‡¥§}
	PI	0,902±0,0532	0,893±0,0575	0,812±0,0539	0,708±0,02 ^{**¥}
NFkB nucleo (DO/mm ²)	Control	0,355±0,018	0,386±0,031	0,43±0,018 [‡]	0,56±0,019 ^{‡¥§}
	PI	0,378±0,029	0,396±0,021	0,438±0,02	0,371±0,034 [*]
IkB (DO/mm ²)	Control	0,89±0,05	0,92±0,07	0,88±0,09	0,80±0,09
	PI	0,84±0,07	0,91±0,06	0,90±0,09	0,85±0,04
IkB-p (DO/mm ²)	Control	0,99±0,03	0,97±0,01	0,98±0,011	1,41±0,06 ^{‡¥}
	PI	0,95±0,02	0,95±0,004	0,96±0,007	0,95±0,01 [*]

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. NFkB: factor de transcripción nuclear kappa B; IκB: Inhibidor de factor kappa B; IκB-P: Inhibidor de factor kappa B fosforilado; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control. ‡ P<0.05 vs Pre-N. ¥ P<0.05 vs Pre-R. § P< 0.05 vs Post-R 10'.

En el caso del NFkB p50, en citosol podemos observar una expresión aumentada de ésta, con significación estadística, en el grupo PI a partir de la reperfusión (figura 37), en cambio, en el núcleo aparecerá más disminuida en este grupo. Por otro lado, tanto el grupo PI como el grupo control presentará a lo largo de las fases del experimento, expresiones progresivamente menores en el citosol, y en cambio solo disminuyen progresivamente en el grupo control del núcleo (figura 38).

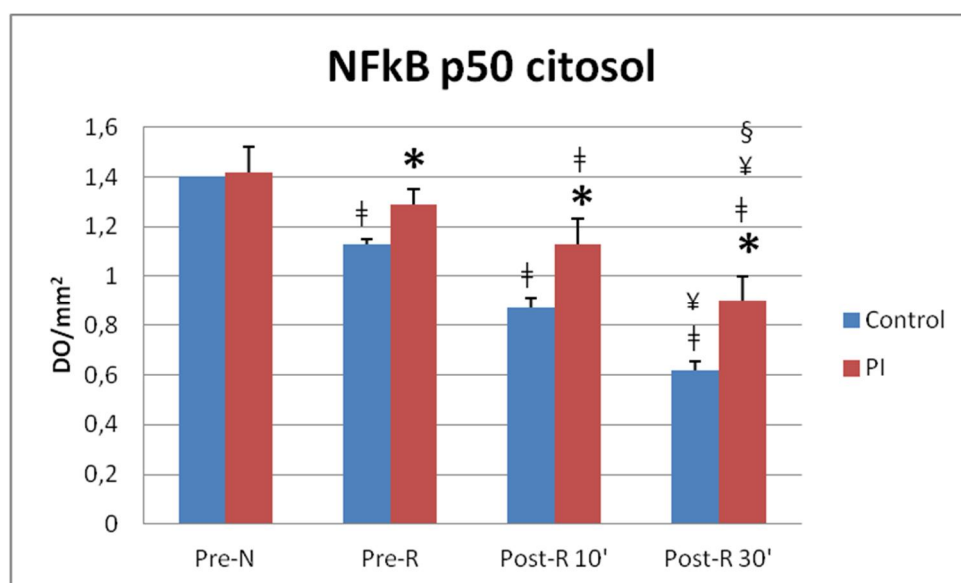


Fig 37: Niveles del Factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB) subunidad p50 citosol. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. NFkB: factor de transcripción nuclear kappa B; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control. ‡ P<0.05 vs Pre-N. ¥ P<0.05 vs Pre-R. § P< 0.05 vs Post-R 10'

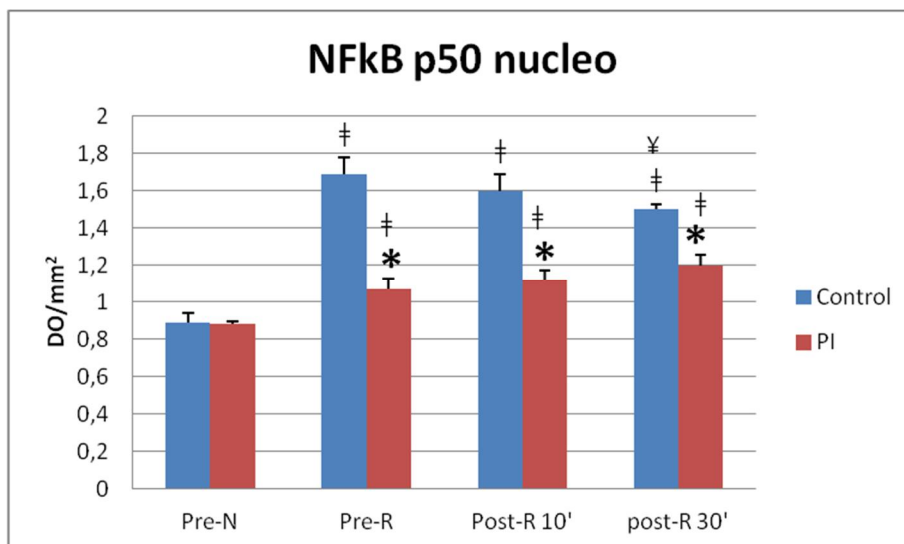


Fig 38: Niveles del Factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB) subunidad p50 nucleo. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. NFkB: factor de transcripción nuclear kappa B; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control. ‡ $P < 0.05$ vs Pre-N. ¥ $P < 0.05$ vs Pre-R.

En la expresión de las subunidades NFkB p52 citosol y núcleo, no se encontraron diferencias durante el estudio (figuras 37 y 38).

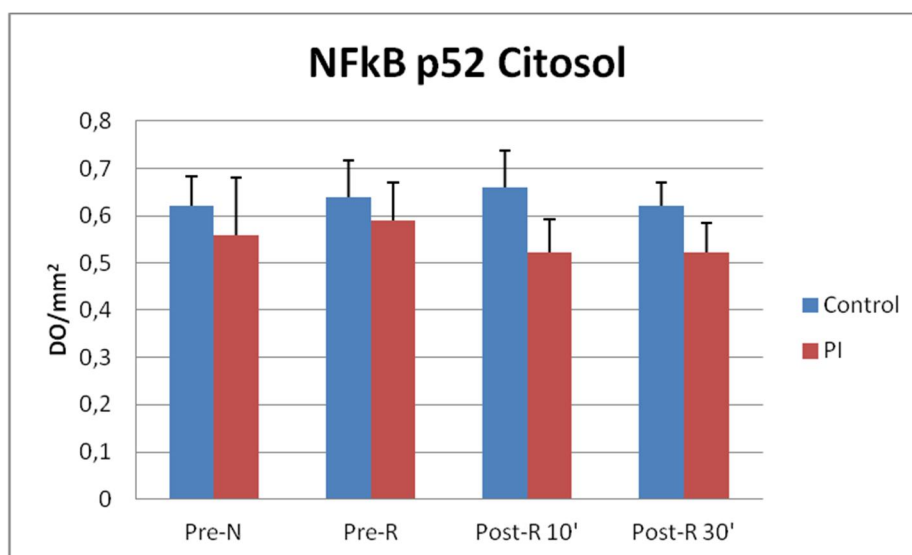


Fig 39: Niveles del Factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB) subunidad p52 citosol. PI: Precondicionamiento isquémico. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. NFkB: factor de transcripción nuclear kappa B; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos.

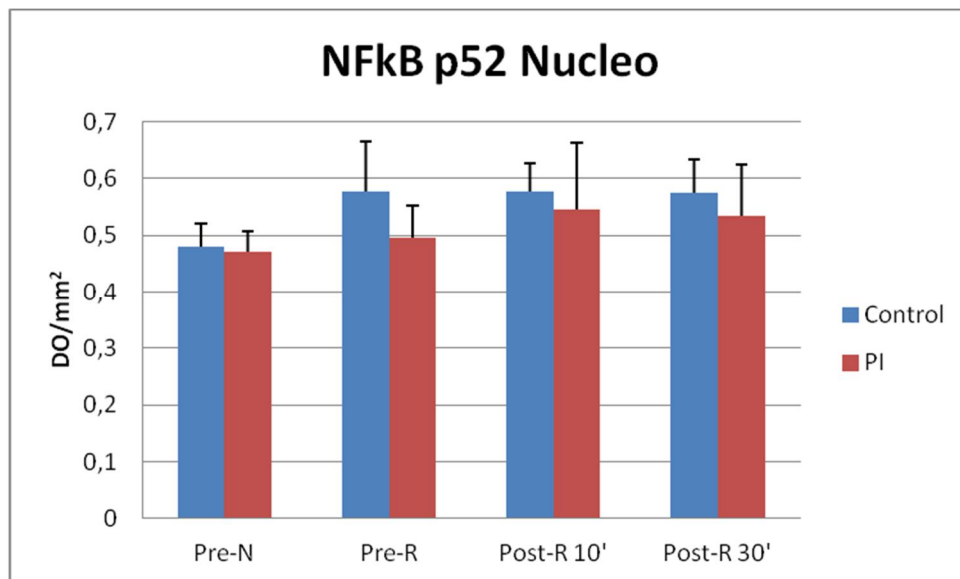


Fig 40: Niveles del Factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB) subunidad p52 nucleo. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. NFkB: factor de transcripción nuclear kappa B; Pre-N: Pre-neumonecromía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos.

Respecto a la subunidad NFkB p65, su expresión se verá aumentada en citosol y disminuida en núcleo con diferencia significativa en el grupo PI tras el minuto 30 de la reperfusión (figura 41 y 42).

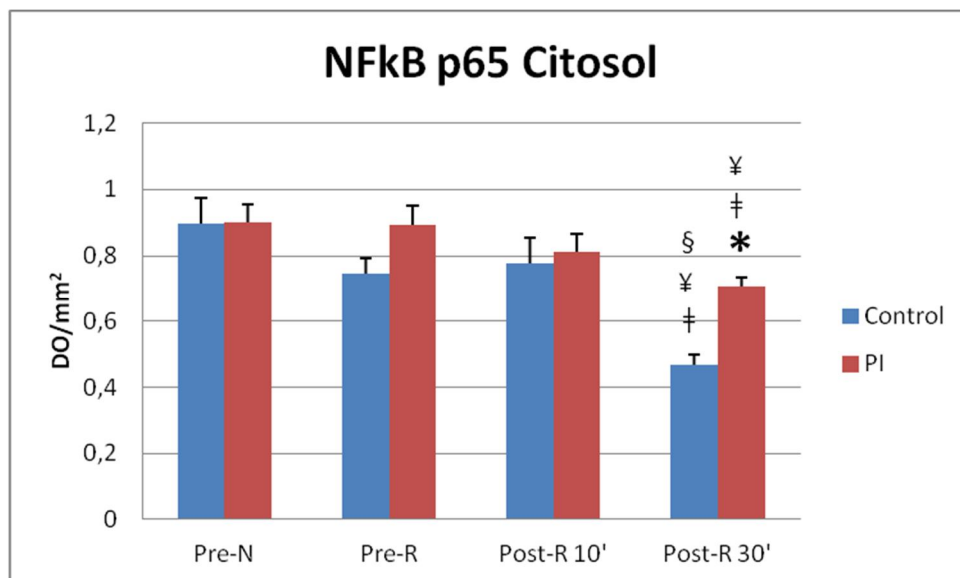


Fig 41: Niveles del Factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB) subunidad p65 citosol. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. NFkB: factor de transcripción nuclear kappa B; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control. \pm $P < 0.05$ vs Pre-N. \forall $P < 0.05$ vs Pre-R. \S $P < 0.05$ vs Post-R 10'

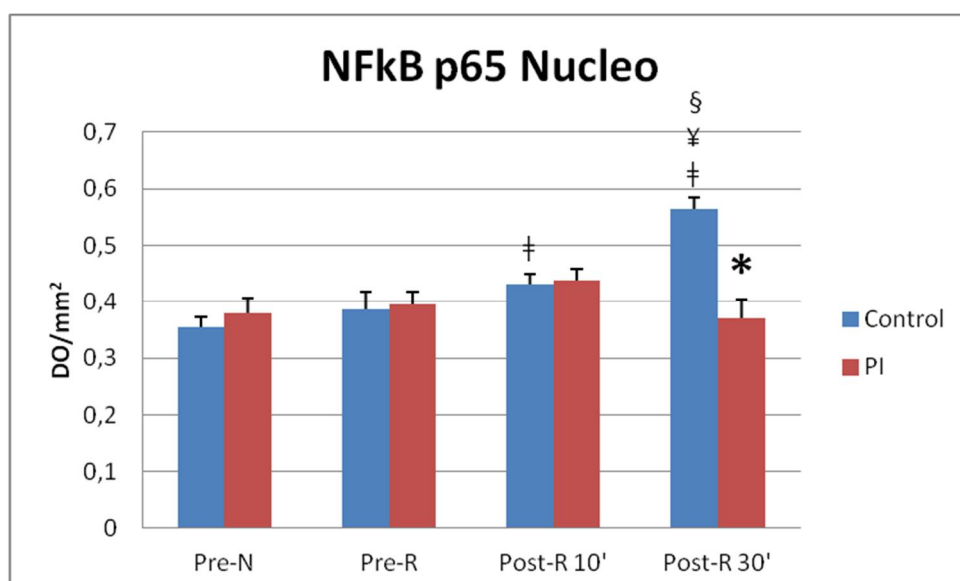


Fig 42: Niveles del Factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB) subunidad p65 nucleo. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. PI: Precondicionamiento isquémico. NFkB: factor de transcripción nuclear kappa B; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperusión; Post-R 10': Post-reperusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperusión a los 30 minutos. * $P < 0.05$ entre grupo PI y Control. \pm $P < 0.05$ vs Pre-N. \forall $P < 0.05$ vs Pre-R. \S $P < 0.05$ vs Post-R 10'

Sin encontrar diferencias estadísticamente significativas, se comprobó una tendencia al aumento de expresión del inhibidor de NFκB (IκB) en el grupo PI, después de la reperfusión (figura 43).

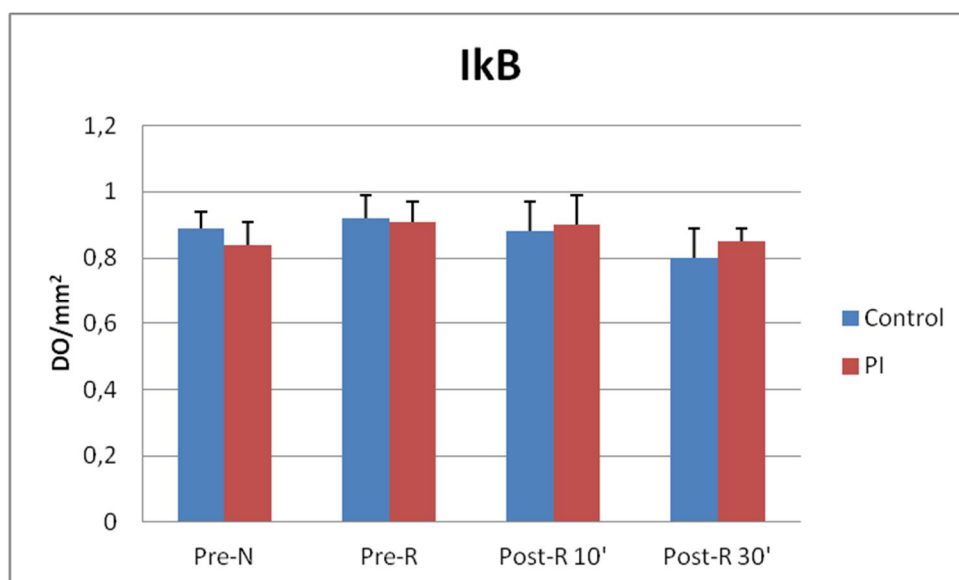


Fig 43: Niveles del Inhibidor de NFκB (IκB). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media; PI: Precondicionamiento isquémico. IκB: Inhibidor de factor kappa B; Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos.

En cambio, sí que se demostró un significativo aumento de expresión en su forma fosforilada (IκB-P) en el grupo control después del minuto 30 post-reperfusión, lo cual favorecerá su degradación y reactivación de NFκB (figura 44).

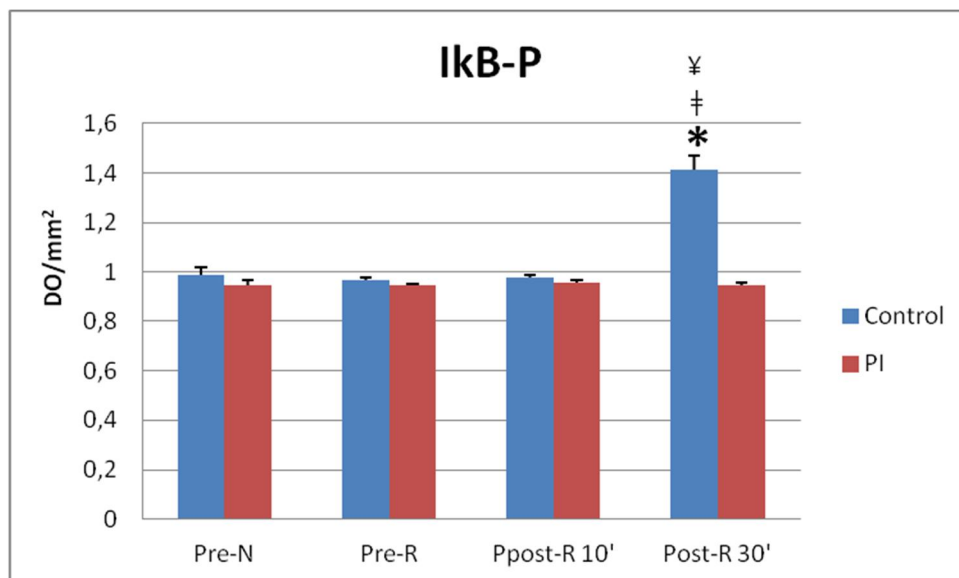


Fig 44: Valores de la forma fosforilada de IκB (IκB-P). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media; PI: Precondicionamiento isquémico. IκB-P: Inhibidor de factor kappa B fosforilado; PI: Precondicionamiento isquémico. Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos. *P<0.05 entre grupo PI y Control. † P<0.05 vs Pre-N. ¥ P<0.05 vs Pre-R.

4.5 RESULTADO HISTOLÓGICO DE TEJIDO PULMONAR

En la tabla 13 y la figuras 45-47 se muestran los resultados del estudio histológico, con microscopía óptica y tinción de hematoxilina eosina, de las biopsias pulmonares realizadas durante la perfusión en el lóbulo reimplantado.

No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a la infiltración del intersticio pulmonar por monocitos/macrófagos o leucocitos, ni en cuanto al grado de edema pulmonar (tabla 13, figuras 45-47).

Tabla 13. Parámetros histológicos de daño pulmonar.

Parámetro	Grupos	Pre-N	Pre-R	Post-R 10'	Post-R30'
Infiltración MM (unidades arbitrarias)	Control	0.57±0.2	1±0.38	0.71±0.29	0.57±0.3
	PI	0.71±0.18	1.3±0.18	0.57±0.2	0.57±0.2
Infiltración Leucocitaria (unidades arbitrarias)	Control	0.71±0.29	0.71±0.29	0.3±0.18	0.57±0.3
	PI	0.86±0.26	1±0.22	0.43±0.3	0.29±0.19
Edema Pulmonar (unidades arbitrarias)	Control	0.43±0.2	0.71±0.29	0.43±0.2	0.29±0.2
	PI	0.43±0.3	0.86±0.26	0.43±0.2	0.14±0.14

Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media; PI: Precondicionamiento isquémico. Infiltración MM: Infiltración por macrófagos/monocitos. PI: Precondicionamiento isquémico. Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos.

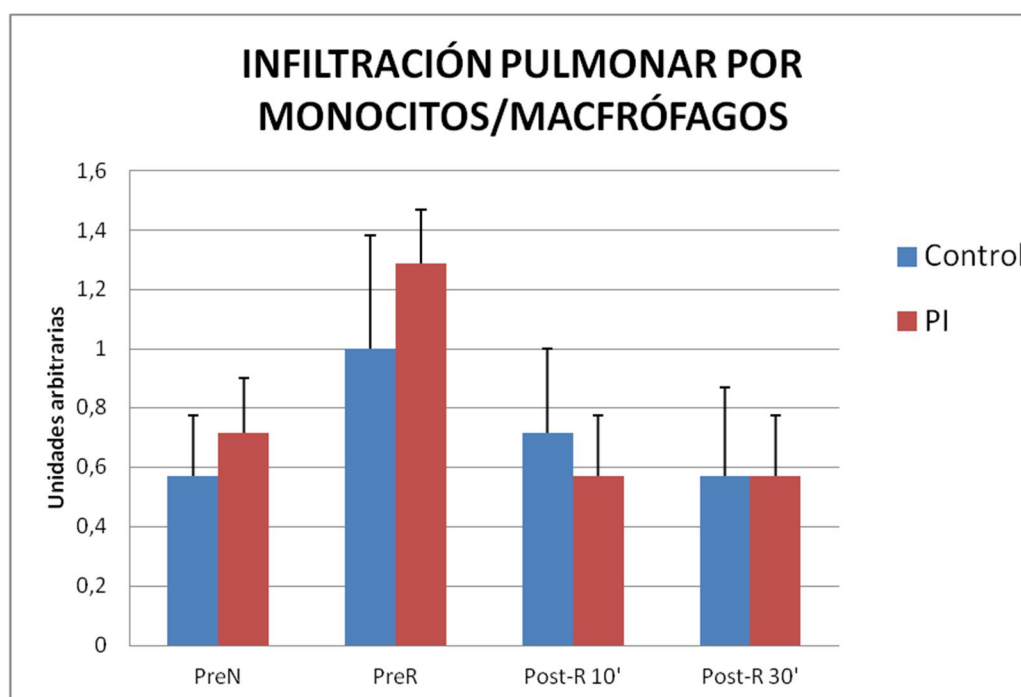


Fig 45: Infiltración de tejido pulmonar por monocitos/macrófagos. Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media; PI: Precondicionamiento isquémico. Infiltración MM: Infiltración por macrófagos/monocitos. PI: Precondicionamiento isquémico. Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos.

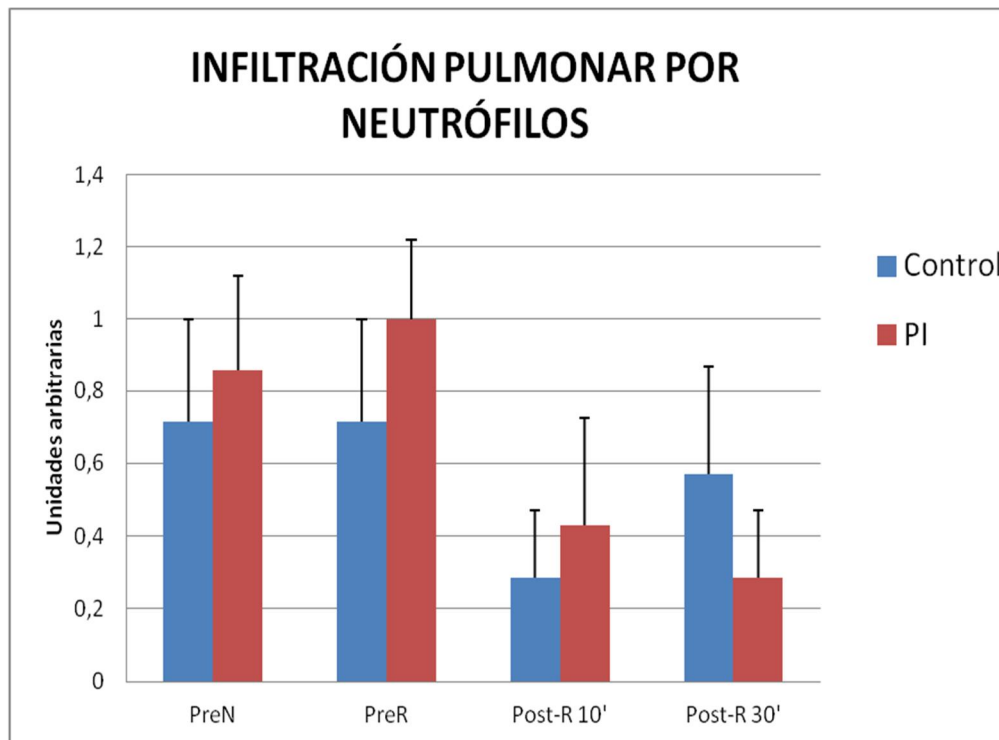


Fig 46: Infiltración de tejido pulmonar por leucocitos neutrófilos. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media; PI: Precondicionamiento isquémico. PI: Precondicionamiento isquémico. Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos.

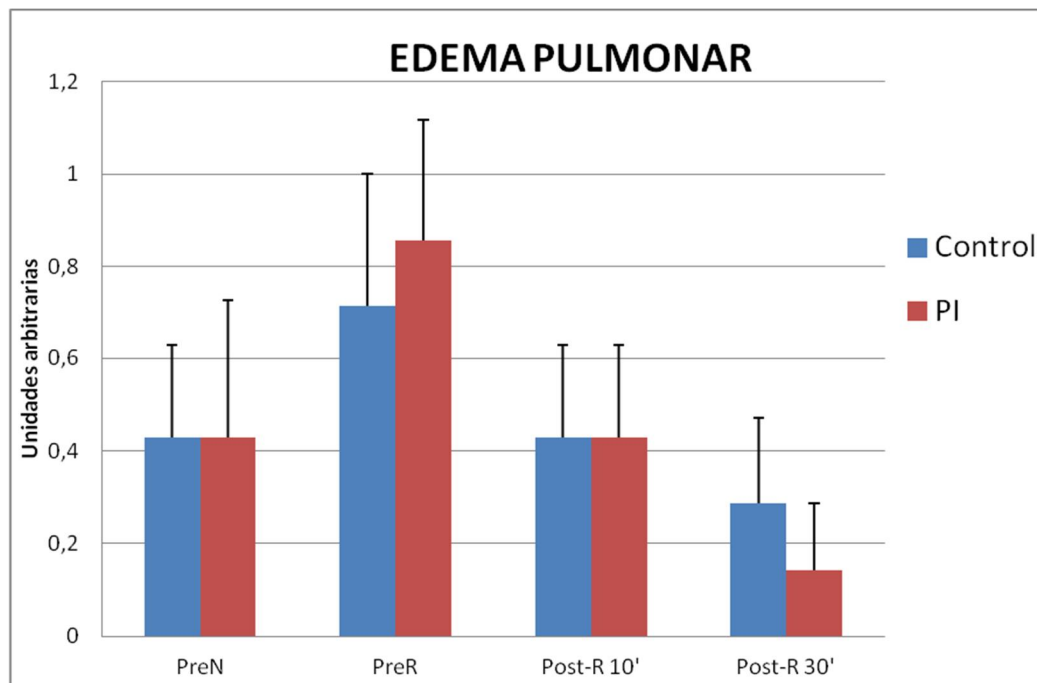


Fig 47: Grado de edema pulmonar. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media; PI: Precondicionamiento isquémico. PI: Precondicionamiento isquémico. Pre-N: Pre-neumonectomía; Pre-R: Pre-reperfusión; Post-R 10': Post-reperfusión a los 10 minutos; Post-R 30': Post-reperfusión a los 30 minutos.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El proceso de isquemia y posterior reperfusión está presente en numerosas situaciones médicas como situaciones de bajo gasto cardiaco, *shock*, procedimientos quirúrgicos mayores y trasplantes de órganos, con consecuencias devastadoras en algunos pacientes debido a su respuesta inflamatoria y de lisis celular. El entendimiento de sus mecanismos es extremadamente importante para investigar nuevas terapias y procedimientos que reduzcan el daño tisular (1;2).

En el caso del síndrome de isquemia reperfusión pulmonar, el procedimiento clásicamente investigado (3-6) y reproducido de forma experimental (80;81), ha sido el trasplante pulmonar, donde el órgano se somete a tiempos prolongados de isquemia fría.

En cambio, en cirugía torácica, cada vez son más las situaciones que requieren de una isquemia caliente o isquemia tibia (manteniendo el órgano a 12-14°C de temperatura) como son la angioplastia de la arteria pulmonar (6), resecciones ex-vivo de tumores pulmonares (7;85;89;90), trasplante pulmonar de donante vivo (87;88;101-103), trombolisis tras embolismo masivo pulmonar (104) o by-pass cardiopulmonar durante circulación extracorpórea (105).

Nuestro modelo experimental por tanto, se asemeja a estas situaciones clínicas, ya que se trata de un proceso de isquemia caliente prolongada, con posterior autotrasplante pulmonar en un mamífero de gran tamaño, y comportamiento biológico similar al humano (29).

Desde que en 1986 Murry et al publicó la primera experiencia sobre preconditionamiento isquémico (60), ha surgido una nueva corriente investigadora a partir de este principio. En su experimento, comparaban entre un grupo control y otro en el que se realizaba la oclusión de la arteria coronaria en 4 intervalos de 5 minutos seguidos de reperusión cada uno. Posteriormente, en ambos grupos ocluían la arteria coronaria durante 40 minutos, y observaron un tamaño de infarto significativamente menor en el grupo del “precondicionamiento isquémico”.

A partir de esta fecha, han sido numerosos los modelos experimentales desarrollados para estudiar los mecanismos del preconditionamiento isquémico en diferentes órganos y con diferentes aplicaciones clínicas: desde PI directo sobre corazón, intestino (63), riñón (64), cerebro (62) e hígado (65), a incluso el PI remoto, basado en aplicar isquemia sobre una extremidad durante periodos cortos, para así obtener efectos protectores antes de la realización de un procedimiento planeado de isquemia/hipoxia prolongada en órgano distante (105-107).

La mayoría de los modelos experimentales de PI en animales han sido realizados en pequeños mamíferos como ratón (95), conejo (66) y perro (68;69), con una amplia variabilidad en el tiempo y el número de ciclos de isquemia. Los resultados de estos experimentos han sido variables, y en ocasiones controvertidos, dependiendo de la especie animal y del órgano estudiado.

Siguiendo los estudios de Gasparri et al (66;107), donde repetidos episodios de isquemia en vez de uno solo parecen tener mejores resultados, y de Friedrich et al(96), que defiende una duración de los ciclos de isquemia de 5 minutos en vez de 10 minutos, hemos desarrollado nuestro modelo experimental de preconditionamiento isquémico para esta tesis, aplicando dos ciclos de isquemia de 5 minutos, con 5 minutos de reperusión entre ellos.

En la actualidad, los estudios basados en PI del pulmón son aun escasos (81;95), y con datos muy variables dependiendo de diferentes especies y diferentes técnicas. Se ha comprobado que los resultados de experimentos con grandes mamíferos guardan mayor coincidencia con humanos (49).

El valor del presente modelo experimental radica en que se trata de uno de los pocos estudios de PI en pulmón realizados en mamífero grande sometido a isquemia caliente pulmonar. El modelo permite el análisis de parámetros hemodinámicos, gasométricos, bioquímicos e histológicos de la respuesta inflamatoria, y presenta grandes similitudes con casos clínicos, como la angioplastia de la arteria pulmonar o el trasplante pulmonar de donante vivo, lo que permite una rápida aplicación de las conclusiones hacia la práctica clínica.

La singularidad de nuestro trabajo radica en ser, hasta donde podemos saber, el primer estudio que evalúa, en un modelo experimental de estas características, el efecto modulador del PI pulmonar sobre la actividad de la proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1 durante las fases iniciales de la IR pulmonar. En el estudio también investigamos la relación entre la actividad de MCP-1 y la expresión de otros mediadores que han sido implicados en su metabolismo en diferentes modelos experimentales y estudios clínicos.

5.1 EFECTOS DEL PI SOBRE LAS VARIABLES HEMODINÁMICAS

La complejidad del procedimiento quirúrgico hace posible que la variabilidad de las constantes hemodinámicas, fruto de la agresión quirúrgica o del manejo anestésico, influya en la respuesta inflamatoria estudiada. Sin embargo, en el estudio, tanto los casos control como los casos PI permanecieron hemodinámicamente estables durante el procedimiento.

Siguiendo la literatura, los tiempos de isquemia pulmonar máxima recomendados oscilan entre 60 minutos en el caso de Van Raemdonck (83), de 120 minutos según Gasparri (66) y Ucar (81), 150 minutos por Li (69) e incluso 180 minutos en el estudio de Friedrich(96). Yamazaki et al (84), realizó un modelo canino de isquemia caliente y autotrasplante de pulmón izquierdo, dividiendo los casos en 4 grupos según el tiempo de isquemia. De este modo, el grupo 1 sería sometido a 60-120 minutos de isquemia, el grupo 2 a 120-240 minutos, el grupo 3 a 240-360 minutos y, finalmente, el grupo 4 a 240-360 minutos de isquemia. Ninguno de los animales del grupo 3 y 4 sobrevivieron debido a la extensa hemorragia intraalveolar y al edema pulmonar. El total de animales del grupo 1 y la mitad del grupo 2 sobrevivieron con diferentes grados de lesión pulmonar característica del SIR. Teniendo en cuenta estas previas experiencias, en nuestro experimento el tiempo medio de isquemia para el grupo control fue de 102 minutos y para el grupo PI de 107 minutos, manteniendo así un periodo isquémico suficiente para observar los efectos del SIR y sin producir un daño pulmonar letal.

Respecto a las variables hemodinámicas, coincidiendo con otras publicaciones similares (66;69), no se observaron diferencias significativamente estadísticas en los dos grupos. Una excepción en nuestros resultados fue la Presión de Arteria

Pulmonar Media (PAPM), que a diferencia de Li et al (69), en la que se demuestra una clara disminución en el grupo PI, en nuestro caso presenta un ascenso significativo justo antes de la neumonectomía y la reperfusión en el grupo PI. Estos valores posteriormente se normalizarán al mismo nivel del grupo control, por lo que podría corresponder a una inicial respuesta de vasoconstricción pulmonar tras el estímulo producido con el PI y su posterior adaptación. En el caso de Ogletree et al(108) atribuye el aumento de PAPM en el SIR a un inmediato aumento de tromboxano tras la isquemia, y su efecto vasoconstrictor. En estudios posteriores experimentales de IR normotérmica, se ha demostrado un aumento de la resistencia vascular pulmonar que persiste durante varias horas en la reperfusión (29;109), por lo que los resultados de la PAPM en nuestro modelo consideramos que aporta una mayor fiabilidad clínica a los datos bioquímicos obtenidos posteriormente.

En resumen, las variables hemodinámicas en nuestro estudio permanecen estables durante todo el experimento, a excepción de la PAPM que presentará niveles más altos en el grupo PI justo antes de la neumonectomía y reperfusión, para igualarse más tarde al grupo control.

5.2 EFECTOS DEL PI SOBRE LAS VARIABLES GASOMÉTRICAS

Al igual que la complejidad del procedimiento podría justificar diferencias hemodinámicas entre los grupos experimentales, problemas en la ventilación durante la intervención también podrían sesgar los resultados. Sin embargo, a la vista de nuestros datos podemos concluir que no existieron diferencias importantes en el manejo ventilatorio de ambos grupos.

En estudios previos de PI en modelos de SIR pulmonar, se ha demostrado un beneficio claro en la oxigenación en el grupo PI, debido probablemente a un mejor funcionamiento del intercambio gaseoso o de la microcirculación pulmonar.

En el caso de Friedrich et al (96), un experimento SIR con isquemia caliente durante 3 horas y posterior reperusión de 8 horas, analizó la concentración de PO₂ durante el experimento. Estas muestras fueron extraídas mediante un catéter en la vena pulmonar inferior izquierda y otro en el lado derecho, obteniendo así resultados gasométricos de ambos pulmones. En el grupo de 5 minutos de PI sobre la arteria pulmonar izquierda, demostró una diferencia significativa en la oxigenación en ambos pulmones, sugiriendo así el carácter no solo local, sino sistémico del SIR y PI. En otros modelos, la muestra de sangre arterial ha sido extraída por la punción directa de la vena pulmonar, confirmando también una mejora con diferencia significativa en las concentraciones de PO₂ en el grupo PI (29;69).

En nuestro experimento, las muestras gasométricas fueron obtenidas en ambos grupos durante todo el experimento mediante un catéter en la arteria femoral. Estos datos presentaron una tendencia a una mejor oxigenación en el grupo PI desde el momento pre-neumonectomía, pero sin diferencias significativas. Además, extrajimos durante la reperusión (minuto 10 y 30 post-reperusión), una muestra arterial puncionando directamente la vena pulmonar inferior izquierda, con una diferencia estadísticamente significativa en el minuto 30 a favor del grupo PI.

En resumen, nuestros resultados están en concordancia con otros estudios ya publicados, confirmando el efecto beneficioso que tiene sobre la oxigenación el PI en un pulmón sometido a IR normotérmica prolongada.

5.3 EFECTOS DEL PI SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y ACTIVACIÓN LEUCOCITARIA

Durante la IR pulmonar, los radicales libres de oxígeno (ROS) son generados por las células endoteliales, los neumocitos II, las células claras, las células epiteliales y los macrófagos alveolares. Estos radicales libres, como son el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\bullet), son moléculas altamente inestables que reaccionan con los ácidos grasos libres de la membrana celular, produciendo peroxidación lipídica y alterando la permeabilidad de la membrana, resultando en un daño y lisis celular (8).

De estas reacciones se generan hidroperóxidos de lípidos, como lipoperoxido (LPO) y aldehídos como malonilaldehído (MDA)(110;111), que usaremos para medir el grado de lipoperoxidación.

En anteriores estudios, ya ha sido demostrado el beneficio del PI en modelos experimentales de SIR sobre el estrés oxidativo. En el caso de Li et al (69), descubrieron en un modelo canino de isquemia fría, durante dos horas y media y trasplante pulmonar izquierdo, que el grupo de PI presentó en tejido pulmonar niveles de MDA significativamente menores tras una hora de reperfusión.

También Yildiz et al (112), en un pulmón aislado de rata, determinaron como el PI atenuaba la elevación de MDA tras dos horas de isquemia caliente.

En el modelo experimental de esta tesis, los niveles de LPO confirmaron los hallazgos de otras publicaciones, con una atenuación del mismo en el grupo PI, demostrando diferencias significativas con el grupo control, desde el momento de la reperfusión. Respecto el MDA, existe paradójicamente un aumento de sus valores en el grupo PI justo antes de la reperfusión, con diferencia estadísticamente significativa. Posteriormente, este grupo mantendrá unos niveles estables, mientras que en grupo control, éstos se verán marcadamente incrementados y superando incluso al grupo PI durante el resto del experimento. Como expone Ucar et al (81) en su publicación sobre PI en un modelo de SIR en pulmón de rata excluido tras isquemia fría de 2 horas, estos paradójicos aumentos de ROS pueden atribuirse a una inicial producción de los mismos tras el estímulo del PI, en una cantidad moderada, y que posteriormente conllevarán a una adaptación y efecto protector tras la reperfusión.

En resumen, en nuestro modelo, se demuestra que PI puede atenuar el estrés oxidativo inducido por la IR, y parece que una breve y moderada elevación de ROS tras el PI, podría tener relación con fenómenos adaptativos.

La mieloperoxidasa (MPO) es la proteína más abundante de los neutrófilos y cataliza la reacción de peróxido de hidrógeno, en un potente agente oxidante. Se relaciona la actividad de MPO con el número de neutrófilos que infiltra el tejido y se utiliza como medida de migración leucocitaria y estrés oxidativo (8).

Eppinger et al (74), en un modelo de IR pulmonar, tras 90 minutos de isquemia caliente en ratas, y reperfusión de 4 horas, demostraron que los hallazgos observados durante los primeros 30 minutos de la reperfusión, eran independientes de la activación leucocitaria, y sus efectos comenzaban a ser

evidentes a partir de las 4 horas. Por tanto, este autor determinó que, el daño por SIR en un proceso bifásico, con una fase precoz mediada por macrófagos, y una fase tardía donde se produce el reclutamiento y activación de neutrófilos (82).

Cuando los neutrófilos activados alcanzan el espacio extravascular, liberan ROS, citoquinas, proteasas, y peroxidasas, que producirán un aumento de permeabilidad microvascular, trombosis y daño del parénquima pulmonar (113). De acuerdo con esto, en nuestro modelo experimental, se observó en el grupo control un aumento de MPO ya desde el minuto 10 de la reperusión, y por otro lado, niveles estadísticamente menores en el grupo PI, apoyando así un posible efecto del PI sobre la activación leucocitaria en casos de SIR.

5.4 EFECTOS DEL PI SOBRE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS

5.4.1 EFECTOS DEL PI SOBRE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS: CITOQUINAS

Desde 1957, que la primera citoquina fue descrita por Isaacs et al (114;115), más de 300 citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento han sido descritos en la literatura, con diferentes funciones y comportamientos y que aún son objeto de investigación debido a su complejidad y variabilidad (116).

En 1998 fue descrito ya por Ward et al (10) que la liberación de estas citoquinas y quimioquinas en la fase temprana del SIR pulmonar, será debido a los fagocitos del pulmón (macrófagos, monocitos y neutrófilos) y posteriores autores han confirmado el carácter bifásico de la respuesta inflamatoria al SIR (74;82). En su fase temprana no-neutrófilo dependiente, cobrarán especial protagonismo los macrófagos alveolares, liberando una amplia variedad de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento que posteriormente desencadenarán la

activación y migración de neutrófilos y moléculas de adhesión hacia el tejido pulmonar desarrollando así el SIR (9).

Dos de las citoquinas más frecuentemente estudiadas en modelos de SIR son el factor de necrosis tisular (TNF- α) y la Interleuquina 1 (IL-1). Estas dos citoquinas han sido estudiadas en exclusión y combinadas en múltiples modelos de SIR y en diferentes órganos además de pulmón (16;17), como hígado (12), corazón, cerebro, y riñón (11). En todos ellos ha sido demostrado que estas citoquinas activan la cascada de inflamación y que su bloqueo atenúa el daño del SIR (15). Es así el caso de Khimenko et al (17), en 1998, que ya relaciona la administración intraperitoneal de anticuerpo anti TNF- α , con un efecto protector sobre el SIR pulmonar en ratones. Posteriormente, Krishnadasan et al (18) en un experimento de isquemia caliente durante 90 minutos, y reperusión de 4 horas en pulmón de roedor, demostraron que la administración previa de anticuerpos anti TNF- α y anti IL-1, disminuyeron el efecto inflamatorio del SIR, con menor daño tisular y una atenuada migración de neutrófilos respecto al grupo control.

Por otro lado, la interleuquina 10 ha sido caracterizada por jugar un potente papel antiinflamatorio en el SIR (8;69;81;95), e incluso en un estudio experimental de Eppinger et al, se administra vía intratraqueal un vector inductor de esta citoquina, para así comprobar su efecto protector tras la reperusión (118).

Aunque existen numerosos modelos experimentales demostrando el efecto beneficioso del PI sobre el SIR pulmonar (66;69;81;83;95), no son muchos los que estudian los mecanismos y regulación que tiene el PI sobre las citoquinas.

Zhang et al, observó en un modelo experimental de de PI sobre isquemia caliente pulmonar en conejo, que los niveles de IL-6, IL-8 y TNF- α disminuyeron significativamente en el grupo PI (119), atenuando, por tanto, la migración de neutrófilos en el tejido.

Friedrich et al, en su experimento de PI sobre un modelos canino de isquemia caliente pulmonar, en el grupo de PI sobre la arteria pulmonar durante cinco minutos, obtuvo un descenso estadísticamente significativo en TNF- α . Respecto a IL-1 e IL-10, no pudo hallar diferencias significativas tal vez por el escaso número de la muestra en cada grupo (96).

Los resultados de nuestro experimento mantienen bastante concordancia con este último autor, sin una diferencia significativa de la IL-10 durante todo el experimento, siendo necesarias futuras investigaciones para entender mejor su comportamiento. En cambio, con nuestro estudio se confirma el efecto modulador del PI sobre TNF- α , que presenta tanto en la expresión de su proteína como en la expresión de su mRNA, un descenso llamativo desde el momento antes de la reperusión. A diferencia del estudio de Friedrich et al, en nuestro caso hemos podido demostrar también diferencias estadísticamente significativas en la regulación de IL-1 tras el PI, que al igual que TNF- α , se presentará disminuida desde antes de la reperusión. Es interesante añadir, que en la determinación de IL-1 mediante Western Blot, se observa en el grupo PI un moderado aumento justo antes de la neumonectomía, probablemente debido al estímulo recibido con el PI, y que posteriormente se mantendrá estable y significativamente por debajo de los niveles alcanzados en el grupo control tras la reperusión. Este hallazgo refuerza la hipótesis de un posible efecto de estímulo y posterior fenómeno adaptativo que el PI puede ejercer sobre el SIR.

En resumen, en nuestro estudio se puede confirmar el efecto beneficioso del PI sobre un modelo de SIR, atenuando la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF- α . No se han observado diferencias significativas respecto a la modulación de la citoquina antiinflamatoria IL-10, y esto puede ser objeto de futuros temas de investigación para comprender mejor su mecanismo de acción.

5.4.2 EFECTOS DEL PI SOBRE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS: QUIMIOQUINA MCP-1

La proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), es una quimioquina que regula la migración y activación de los macrófagos y monocitos, se ha demostrado anteriormente su papel crucial en el SIR y su expresión determinará la modulación del daño pulmonar. Zhao en su modelo experimental de SIR con pulmón de roedor, demuestra que la producción tanto de citoquinas como de MCP-1 está relacionada con la fase temprana del SIR dependiente de macrófagos y que por tanto, la inhibición previa de estas células desencadenará una menor liberación de estos mediadores inflamatorios y una atenuación del daño por SIR (120).

También es sabido que la expresión de MCP-1 en las células epiteliales puede ser estimulada por la IL-1 y el TNF- α , manteniendo así interrelaciones entre ellas. Sica et al obtuvieron en un experimento in vitro con cordón umbilical, niveles aumentados de MCP-1 tras el estímulo con IL-1 y TNF- α de las células endoteliales (121).

Ajuebor et al también demostraron la relación entre IL-1 y MCP-1, inyectando de forma intraperitoneal IL-1 en ratones y observando el incremento de MCP-1. También demostraron la atenuación de este incremento tras la administración de antagonista anti IL-1 (25).

Ha sido ampliamente investigado el papel de la MCP-1 en otras enfermedades como tuberculosis, patología autoinmune (20), VIH/SIDA (23), diabetes, arterioesclerosis (24) o cáncer (21;122;123).

Al igual que previamente han sido estudiadas diferentes vías de supresión de TNF- α e IL-1 para el manejo y control en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide o enfermedad de Crohn (21;124;125), en los últimos años han surgido numerosos estudios de investigación enfocados en los diferentes mecanismos de acción de MCP-1 en estas patologías del sistema inmune con el objetivo de obtener una vía de inhibición y regulación (21;126-129). Incluso se han presentado estudios prometedores en determinados tipos de cáncer, donde se ha visto que la modulación de esta quimioquina podría jugar un papel fundamental en su prevención y tratamiento (122;128).

A pesar de la amplia literatura existente sobre MCP-1 en estos campos, no existen muchos estudios aplicados sobre el SIR pulmonar y el comportamiento de la misma (74;120).

El modelo de esta tesis, es uno de los pocos descritos como estudio de MCP-1 en un experimento de isquemia pulmonar y reperfusión. Nuestros resultados, demuestran un aumento de MCP-1 y del MCP-1 mRNA durante las diferentes etapas, una vez se produce la isquemia, justo antes de la reperfusión, y durante fases precoces de la reperfusión. Estos datos, como veremos a continuación, son similares a los de otros autores en estudios con roedores, y confirma así el papel crucial que tiene esta quimioquina en el desarrollo del SIR.

Krishnadasan et al, en un modelo de isquemia caliente durante 90 minutos en pulmón de roedor, y posterior reperfusión de 4 horas, demuestra la implicación

que MCP-1 tiene sobre el daño pulmonar, mediando sobre la liberación de otras citoquinas y influenciando en la migración de neutrófilos. También comprueba el efecto protector obtenido en el grupo al que le fue administrado un anticuerpo antiMCP-1 (130).

Naidu et al también demostraron en un modelo similar de isquemia caliente y reperfusión en pulmón de ratón, la relación de MCP-1 con el daño tisular en SIR, y el papel beneficioso de modularla, mediante la administración de un inhibidor de quimioquina de amplio espectro (32).

Hasta la fecha, uno de los escasos modelos experimentales de SIR pulmonar publicados en la literatura sobre el comportamiento de MCP-1 en mamífero grande es el de Simón et al. En este estudio se analizan, durante las diferentes fases del experimento, las variaciones de MCP-1, demostrando su aumento tras un periodo de isquemia y durante la reperfusión (29).

Son aún más escasos los estudios publicados sobre el efecto del PI sobre MCP-1 en un modelo experimental de SIR pulmonar. En el estudio de Huerta et al, se determinan MCP-1 y otras citoquinas en biopsias hepáticas durante un procedimiento de isquemia reperfusión pulmonar en cerdo. Los autores observan un aumento de estos mediadores, incluida la MCP-1, en tejido hepático durante la reperfusión, y una atenuación significativa de este incremento cuando el pulmón es sometido a preconditionamiento isquémico (131). Estos resultados nos llevan a comparar con nuestros datos, tomados a partir de biopsia pulmonar, donde el grupo PI presenta también una disminución estadísticamente significativa del nivel de esta quimioquina respecto al grupo control, ya desde el momento previo a la reperfusión. No obstante, en nuestro caso, en el grupo PI aparece una elevación

transitoria de la expresión de MCP-1 mRNA en el momento previo a la reperfusión en comparación con el grupo control. Este leve aumento, observado después de la isquemia, pero no durante la reperfusión, puede estar en relación con una reducida liberación de MCP-1, tras el estímulo del PI, al igual que fue observado previamente en la medición de los radicales libres, y con un posible efecto adaptativo al SIR.

En resumen, en nuestro modelo experimental observamos que la IR pulmonar induce aumento de actividad MCP-1 en tejido pulmonar, que este aumento está en relación con elevación de las citoquinas inflamatorias TNF- α e IL-1, y que, como contribución original a la literatura, el PI pulmonar es capaz de bloquear este efecto.

5.4.3 EFECTO DEL PI SOBRE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

El factor nuclear kappa b (NFkB) es un importante factor de transcripción de rápida respuesta que en los últimos años ha cobrado especial protagonismo en el estudio de los mecanismos de respuesta inflamatoria y apoptosis.

En células que no han recibido ningún estímulo, el NFkB permanece ligado a su inhibidor (IkB) en el citoplasma. IkB unido a NFkB, impide a éste desplazarse hasta el núcleo, donde desencadenaría la transcripción de genes. En cambio, en células estimuladas, señales proinflamatorias llegan desde RLO, IL1 y TNF α y desencadenan la cascada de activación del complejo NFkB/IkB. De este modo, mediante la kinasa IKK, IkB es fosforilado, y posteriormente degradado, de forma que NFkB resultará liberado para introducirse en el núcleo de la célula y comenzar su transcripción genética promotora de daño celular (132).

La activación de NFkB se ha visto relacionada con la regulación de diferentes síndromes inflamatorios, como peritonitis o artritis reumatoide que lo convierten en objetivo de nuevas vías terapéuticas (133).

El NFkB se verá envuelto también en enfermedades cardiovasculares como infarto de miocardio, cardiomiopatía dilatada e hipertensión pulmonar. En esta última patología, Li et al ha observaron el efecto beneficioso de inhibir NFkB en un modelo de ratones con hipertensión pulmonar inducida (134)

Se ha visto relacionada también, su participación en los procesos tumorales, debido a su regulación de respuestas inmunomoduladoras y a la expresión de diferentes genes responsables del crecimiento celular o la apoptosis (123)

En el estudio del SIR, se ha demostrado la presencia de niveles elevados de NFkB, y los efectos beneficiosos de su supresión. De este modo, Chen et al observaron que la inhibición de IKK en intestino sometido a isquemia-reperfusión, modulará la respuesta inflamatoria sistémica en un modelo experimental con ratones (135)

En el SIR pulmonar, han sido publicados diversos estudios destacando el efecto beneficioso de suprimir este factor de transcripción. Entre ellos se encuentra el caso de Ross et al en 1999, que administró Pirrolidin Ditiocarbamato (PDTC), un potente inhibidor de NFkB, al pulmón durante el periodo de preservación previo al trasplante en humanos, obteniendo un efecto protector en el postoperatorio de estos pacientes, con mejores niveles de oxigenación, reducción del edema y de la presión de la arteria pulmonar (136)

Posteriormente, Krishnadasan et al en 2000 confirmó también, en un modelo experimental de isquemia-reperfusión pulmonar en ratones, el efecto protector de

agentes inhibidores de NFkB, como tacrolimus o ciclosporina (117), y más adelante, Naidu et al en 2003, en un ensayo experimental similar, confirmó el mismo beneficio con la inyección esta vez de simvastatina (137)

En cuanto a modelos experimentales de autotransplante pulmonar que estudien el efecto de este factor de transcripción, existen escasas publicaciones, entre ellas, Ishiyama et al, que realiza en ratones, un trasplante pulmonar ortotópico, con administración de un supresor de NFkB, y demuestra su efecto beneficioso en comparación con el grupo control (132)

Serán aún más escasos los estudios publicados hasta el momento, sobre la respuesta moduladora del preconditionamiento isquémico sobre el NFkB.

Funaki et al, en un modelo de preconditionamiento isquémico hepático en roedor, determinó la reducción en los niveles de este factor de transcripción en comparación con el grupo control (138)

Los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental coincidirán por tanto con este último autor, ya que observamos en el grupo PI, una disminución significativa en la expresión de los subtipos nucleares (y por tanto la forma activada de NFkB) p50 y p65, así como su aumento en las formas inactivas del citosol. En cuanto a los subtipos p52 del núcleo y citosol, no se han observado diferencias significativas en nuestro ensayo. En un estudio de Goto et al sobre el estímulo celular in vitro con IL1, demuestra el efecto que desencadena sobre NFkB p50 y p65, y en cambio, no se manifiestan hallazgos en p52 (139). Esto nos lleva a pensar, que tal vez exista un mecanismo de estímulo y activación diferente para este subtipo de NFkB lo que puede suponer el objetivo de nuevas investigaciones en el futuro.

Por último, en nuestro experimento, hemos medido la expresión de la forma fosforilada de I κ B (I κ B-P), es decir, su forma degradada mediante IKK, y por tanto promotora de la forma nuclear activada de NF κ B, la cual es marcadamente elevada en el grupo control en el minuto 30 de la reperusión, lo que refuerza la validez clínica de nuestro experimento.

5.5 EFECTO DEL PI SOBRE EL TEJIDO PULMONAR

En nuestro estudio no pudimos objetivar diferencias histológicas significativas entre ambos grupos. Se observa una tendencia a presentar menor infiltración del intersticio pulmonar por macrófagos/monocitos, leucocitos y edema en los casos sometidos a preconditionamiento. Dos de las principales limitaciones del estudio son el reducido tiempo de reperusión y el tamaño muestral, que podrían ser insuficientes para detectar diferencias morfológicas. Estas diferencias podrían manifestarse en futuros estudios con mayor tiempo de reperusión o mayor número de experimentos.

En resumen, hemos presentado un modelo experimental de autotransplante pulmonar en cerdo, que demuestra la modulación del SIR mediante el PI, en nuestro caso, realizando 5 minutos de isquemia de la arteria pulmonar con 5 minutos de reperusión en dos ocasiones. Esta modulación mediante el PI queda reflejada no solo en la regulación del estrés oxidativo y citoquinas como otros autores han demostrado hasta la fecha, sino que también hemos incluido en nuestro estudio la determinación de la quimioquina MCP-1 y factores de transcripción. En relación a estos mediadores, hemos podido confirmar disminuciones significativas de su expresión en el grupo PI tras la reperusión, lo que convierte a este experimento en uno de los escasos hasta la fecha existente

en la literatura que compare MCP-1 y factores de transcripción en un modelo de PI en animal de gran tamaño, y que por tanto, guardará mayor similitud con el comportamiento biológico en humanos. Por otro lado, este estudio concluye con una obtención de mejores niveles de oxigenación pulmonar en el grupo PI, lo que destaca el potencial papel que puede tener el PI en el futuro en la prevención de SIR en el trasplante y de otras situaciones que impliquen una isquemia pulmonar prolongada.

Como limitaciones del trabajo, debemos incluir la complejidad y larga duración de experimento, los tiempos quirúrgicos, complicaciones técnicas como sangrado o estenosis de anastomosis broncovasculares oscilan inevitablemente, pero en conjunto la homogeneidad de las determinaciones hemodinámicas y gasométricas hasta el final del estudio, confieren seguridad a las otras variables estudiadas. Por otro lado, estas situaciones se asemejarán a las experimentadas en situaciones quirúrgicas reales en humanos, dándole a nuestros resultados un mayor valor clínico.

Como ya se ha comentado, otra limitación sería la brevedad del tiempo de estudio tras la reperusión. En futuros estudios, sería de gran interés su prolongación con el fin determinar mayores variaciones en el comportamiento de las variables histológicas y fisiológicas.

Finalmente, creemos que, a pesar de las limitaciones expuestas, los resultados del presente estudio refuerzan el interés en el preconditionamiento isquémico como una poderosa herramienta para la prevención del daño pulmonar ocasionado por los diferentes procesos clínicos y quirúrgicos que conllevan isquemia reperusión pulmonar.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En el presente modelo experimental de autotrasplante pulmonar se demuestra que la isquemia-reperfusión pulmonar induce un aumento pulmonar de la proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1, que este se asocia a un aumento de actividad en pulmón de TNF-alfa e IL1, y que el preconditionamiento isquémico pulmonar atenúa la elevación de estas tres moléculas proinflamatorias.
2. En este modelo, la isquemia-reperfusión pulmonar indujo un incremento de estrés oxidativo y de activación leucocitaria en tejido pulmonar, y estos efectos fueron también atenuados, desde los primeros momentos de la perfusión, por la realización de preconditionamiento isquémico pulmonar.
3. La isquemia-reperfusión pulmonar produce un aumento de la expresión en tejido pulmonar del mediador de transcripción celular NFkB y este efecto es atenuado por el preconditionamiento isquémico pulmonar.
4. En el presente estudio el pulmón sometido a preconditionamiento isquémico presentó, durante la perfusión, una mejor capacidad de oxigenación de la sangre que el pulmón no sometido al preconditionamiento.
5. Este trabajo no ha permitido correlacionar el nivel de expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos MCP1 con diferencias en la infiltración del tejido pulmonar por monocitos/macrófagos durante el periodo de isquemia pulmonar, ni durante los primeros minutos de perfusión del pulmón sometido a isquemia prolongada.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Kaszaki J, Wolfard A, Szalay L, Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2006 Apr;38(3):826-8.
- (2) Di NP, Taccardi AA, De CR, Barsotti A. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: experimental data. *Ital Heart J* 2002 Jun;3 Suppl 4:24S-8S.
- (3) Padilla AM, Padilla JD. [Lung preservation: current practices] *Arch Bronconeumol* 2004 Feb;40(2):86-93.
- (4) King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, et al. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg* 2000 Jun;69(6):1681-5.
- (5) Sharma AK, Stone ML, Lau CL, Laubach VE. Pulmonary Transplantation and Ischemia-Reperfusion Injury. In: Prof Cardoso P., editor. *Topics in Thoracic Surgery*. InTech; 2012. p. 377-400.
- (6) Read RC, Ziomek S, Ranval TJ, Eidt JF, Gocio JC, Schaefer RF. Pulmonary artery sleeve resection for abutting left upper lobe lesions. *Ann Thorac Surg* 1993 Apr;55(4):850-4.
- (7) Hendrix H, Schmitt J, Aebert H. [Ex situ sleeve resection and autotransplantation of the left lower pulmonary lobe after extended pneumonectomy]. *Chirurg* 2000 Jul;71(7):820-3.
- (8) de PM, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 Feb 15;167(4):490-511.

- (9) McCourtie AS, Merry HE, Farivar AS, Goss CH, Mulligan MS. Alveolar macrophage secretory products augment the response of rat pulmonary artery endothelial cells to hypoxia and reoxygenation. *Ann Thorac Surg* 2008 Mar;85(3):1056-60.
- (10) Ward PA. Phagocytes and the lung. *Ann N Y Acad Sci* 1997 Dec 15;832:304-10.
- (11) Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 1999 Jul;162(1):196-203.
- (12) Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996 Mar;23(3):506-14.
- (13) Furuichi K, Wada T, Yokoyama H, Kobayashi KI. Role of Cytokines and Chemokines in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Drug News Perspect* 2002 Oct;15(8):477-82.
- (14) Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SI. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg* 1990 Dec;212(6):694-700.
- (15) Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003 Feb;125(2):261-72.
- (16) Chang DM, Hsu K, Ding YA, Chiang CH. Interleukin-1 in ischemia-reperfusion acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 Oct;156(4 Pt 1):1230-4.

- (17) Khimenko PL, Bagby GJ, Fuseler J, Taylor AE. Tumor necrosis factor- α in ischemia and reperfusion injury in rat lungs. *J Appl Physiol* (1985) 1998 Dec;85(6):2005-11.
- (18) Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, et al. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 2002 Oct;22(10):1067-8.
- (19) Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001 Aug;250(2):91-104.
- (20) Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009 Jun;29(6):313-26.
- (21) Conti I, Rollins BJ. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol* 2004 Jun;14(3):149-54.
- (22) Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today* 2000 Sep;21(9):418-20.
- (23) Bernasconi S, Cinque P, Peri G, Sozzani S, Crociati A, Torri W, et al. Selective elevation of monocyte chemotactic protein-1 in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with cytomegalovirus encephalitis. *J Infect Dis* 1996 Nov;174(5):1098-101.
- (24) Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998 Aug 27;394(6696):894-7.
- (25) Ajuebor MN, Flower RJ, Hannon R, Christie M, Bowers K, Verity A, et al. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *J Leukoc Biol* 1998 Jan;63(1):108-16.

- (26) Colotta F, Sciacca FL, Sironi M, Luini W, Rabiet MJ, Mantovani A. Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol* 1994 May;144(5):975-85.
- (27) Wain JH, Kirby JA, Ali S. Leucocyte chemotaxis: Examination of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase activation by Monocyte Chemoattractant Proteins-1, -2, -3 and -4. *Clin Exp Immunol* 2002 Mar;127(3):436-44.
- (28) Colotta F, Borre A, Wang JM, Tattaneli M, Maddalena F, Polentarutti N, et al. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1992 Feb 1;148(3):760-5.
- (29) Simon AC, Gonzalez-Casaurran G, Azcarate PL, Isea VJ, Vara AE, Garcia MC, et al. Experimental Swine lung autotransplant model to study lung ischemia-reperfusion injury. *Arch Bronconeumol* 2011 Jun;47(6):283-9.
- (30) Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, Flores LM, Jo EK, Montano M, et al. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* 2005 Dec 19;202(12):1649-58.
- (31) Navratilova Z, Mrazek F, Kriegova E, Huttyrova B, Kolek V, du Bois RM, et al. The MCP-1-2518 (A to G) single nucleotide polymorphism in Czech patients with pulmonary sarcoidosis: association with Lofgren's syndrome. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2007 Mar;24(1):33-8.
- (32) Naidu BV, Farivar AS, Woolley SM, Grainger D, Verrier ED, Mulligan MS. Novel broad-spectrum chemokine inhibitor protects against lung

- ischemia-reperfusion injury. J Heart Lung Transplant 2004 Jan;23(1):128-34.
- (33) Krishnadasan B, Farivar AS, Naidu BV, Woolley SM, Byrne K, Fraga CH, et al. Beta-chemokine function in experimental lung ischemia-reperfusion injury. Ann Thorac Surg 2004 Mar;77(3):1056-62.
 - (34) Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. Trends Biochem Sci 2005 Jan;30(1):43-52.
 - (35) Hausen B, Beuke M, Schroeder F, Poets CF, Hewitt C, DelRossi AJ, et al. In vivo measurement of lung preservation solution efficacy: comparison of LPD, UW, EC and low K+-EC following short and extended ischemia. Eur J Cardiothorac Surg 1997 Nov;12(5):771-9.
 - (36) Keshavjee SH, Yamazaki F, Yokomise H, Cardoso PF, Mullen JB, Slutsky AS, et al. The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 1992 Feb;103(2):314-25.
 - (37) Haniuda M, Hasegawa S, Shiraishi T, Dresler CM, Cooper JD, Patterson GA. Effects of inflation volume during lung preservation on pulmonary capillary permeability. J Thorac Cardiovasc Surg 1996 Jul;112(1):85-93.
 - (38) Aoe M, Okabayashi K, Cooper JD, Patterson GA. Hyperinflation of canine lung allografts during storage increases reperfusion pulmonary edema. J Thorac Cardiovasc Surg 1996 Jul;112(1):94-102.
 - (39) McRae KM. Pulmonary transplantation. Curr Opin Anaesthesiol 2000 Feb;13(1):53-9.

- (40) Liu M, Tremblay L, Cassivi SD, Bai XH, Mourgeon E, Pierre AF, et al. Alterations of nitric oxide synthase expression and activity during rat lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 May;278(5):L1071-L1081.
- (41) Pinsky DJ, Naka Y, Chowdhury NC, Liao H, Oz MC, Michler RE, et al. The nitric oxide/cyclic GMP pathway in organ transplantation: critical role in successful lung preservation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Dec 6;91(25):12086-90.
- (42) Waldow T, Alexiou K, Witt W, Wagner FM, Kappert U, Knaut M, et al. Protection of lung tissue against ischemia/reperfusion injury by preconditioning with inhaled nitric oxide in an in situ pig model of normothermic pulmonary ischemia. *Nitric Oxide* 2004 Jun;10(4):195-201.
- (43) Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, Hooper TL. Low-dose nitric oxide inhalation during initial reperfusion enhances rat lung graft function. *Ann Thorac Surg* 1997 Feb;63(2):339-44.
- (44) Eppinger MJ, Ward PA, Jones ML, Bolling SF, Deeb GM. Disparate effects of nitric oxide on lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1995 Nov;60(5):1169-75.
- (45) Fehrenbach A, Wittwer T, Meyer D, von VS, Viehover M, Fehrenbach H, et al. Nitroglycerin alters alveolar type II cell ultrastructure after ischemia and reperfusion. *J Heart Lung Transplant* 2001 Aug;20(8):876-88.
- (46) de PM, Fischer S, Liu M, Jin R, Bai XH, Waddell TK, et al. Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro- to anti-inflammatory cytokines. *Transplantation* 2001 Nov 15;72(9):1505-12.

- (47) Lockinger A, Schutte H, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F. Protection against gas exchange abnormalities by pre-aerosolized PGE1, iloprost and nitroprusside in lung ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2001 Jan 27;71(2):185-93.
- (48) Buchanan SA, Mauney MC, Parekh VI, DeLima NF, Binns OA, Cope JT, et al. Intratracheal surfactant administration preserves airway compliance during lung reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1996 Dec;62(6):1617-21.
- (49) Luh SP, Yang PC. Organ preconditioning: the past, current status, and related lung studies. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006 May;7(5):331-41.
- (50) Hiratsuka M, Yano M, Mora BN, Nagahiro I, Cooper JD, Patterson GA. Heat shock pretreatment protects pulmonary isografts from subsequent ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 1998 Dec;17(12):1238-46.
- (51) Turan NN, Demiryurek AT. Preconditioning effects of peroxynitrite in the rat lung. *Pharmacol Res* 2006 Nov;54(5):380-8.
- (52) Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology* 2000 Mar;92(3):833-40.
- (53) Keshavjee S, Davis RD, Zamora MR, de PM, Patterson GA. A randomized, placebo-controlled trial of complement inhibition in ischemia-reperfusion injury after lung transplantation in human beings. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005 Feb;129(2):423-8.
- (54) Torras J, Bordalba JR, Seron D, Moliner R, Carrera M, Valles J, et al. Protective effect of the PAF antagonist BN 52021 in an experimental renal warm ischemia model. *Transpl Int* 1993;6(4):236-8.

- (55) Kalimeris K, Nastos C, Papoutsidakis N, Xanthopoulou MN, Defterevos G, Tympa A, et al. Iron chelation prevents lung injury after major hepatectomy. *Hepatol Res* 2010 Aug;40(8):841-50.
- (56) Kohmoto J, Nakao A, Kaizu T, Tsung A, Ikeda A, Tomiyama K, et al. Low-dose carbon monoxide inhalation prevents ischemia/reperfusion injury of transplanted rat lung grafts. *Surgery* 2006 Aug;140(2):179-85.
- (57) Balibrea-Cantero JL, Arias-Diaz J, Garcia C, Torres-Melero J, Simon C, Rodriguez JM, et al. Effect of pentoxifylline on the inhibition of surfactant synthesis induced by TNF-alpha in human type II pneumocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 Mar;149(3 Pt 1):699-706.
- (58) Ke B, Shen XD, Gao F, Qiao B, Ji H, Busuttil RW, et al. Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 (HO-1) reinforces liver apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in mice: HO-1 is necessary for cytoprotection. *Hum Gene Ther* 2009 Oct;20(10):1133-42.
- (59) Cassivi SD, Liu M, Boehler A, Pierre A, Tanswell AK, O'Brodovich H, et al. Transplant immunosuppression increases and prolongs transgene expression following adenoviral-mediated transfection of rat lungs. *J Heart Lung Transplant* 2000 Oct;19(10):984-94.
- (60) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986 Nov;74(5):1124-36.
- (61) Pang CY, Forrest CR. Acute pharmacologic preconditioning as a new concept and alternative approach for prevention of skeletal muscle ischemic necrosis. *Biochem Pharmacol* 1995 Apr 18;49(8):1023-34.

- (62) Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994 Jul;14(4):545-53.
- (63) Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 May 6;222(1):27-32.
- (64) Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol* 1997 Jun;79(6):842-7.
- (65) Grande L, Rosello-Catafau J, Peralta C. [Ischemic preconditioning of the liver: from molecular bases to clinical application]. *Cir Esp* 2006 Nov;80(5):275-82.
- (66) Gasparri RI, Jannis NC, Flameng WJ, Lerut TE, Van Raemdonck DE. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999 Dec;16(6):639-46.
- (67) Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993 Sep;88(3):1264-72.
- (68) Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993 Jun;72(6):1293-9.
- (69) Li G, Chen S, Lou W, Lu E. Protective effects of ischemic preconditioning on donor lung in canine lung transplantation. *Chest* 1998 May;113(5):1356-9.

- (70) Koti RS, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, Davidson BR. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. *FASEB J* 2005 Jul;19(9):1155-7.
- (71) Ricciardi R, Shah SA, Wheeler SM, Quarfordt SH, Callery MP, Meyers WC, et al. Regulation of NFkappaB in hepatic ischemic preconditioning. *J Am Coll Surg* 2002 Sep;195(3):319-26.
- (72) Fernandez L, Heredia N, Grande L, Gomez G, Rimola A, Marco A, et al. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology* 2002 Sep;36(3):562-72.
- (73) Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G, et al. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 2002 Apr 27;73(8):1203-11.
- (74) Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol* 1997 May;150(5):1773-84.
- (75) Zhao M, Fernandez LG, Doctor A, Sharma AK, Zarbock A, Tribble CG, et al. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 Nov;291(5):L1018-L1026.
- (76) Naidu BV, Farivar AS, Woolley SM, Grainger D, Verrier ED, Mulligan MS. Novel broad-spectrum chemokine inhibitor protects against lung ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 2004 Jan;23(1):128-34.
- (77) Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, et al. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced

- in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990 Apr 15;144(8):3034-8.
- (78) Penton-Rol G, Polentarutti N, Luini W, Borsatti A, Mancinelli R, Sica A, et al. Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma. *J Immunol* 1998 Apr 15;160(8):3869-73.
- (79) Davies LG, Rosser TH, West LR. Autotransplantation of the lung in sheep. *Thorax* 1965 Nov;20(6):481-94.
- (80) Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR, et al. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest* 1998 Jul;114(1):51-60.
- (81) Ucar G, Topaloglu E, Kandilci HB, Gumusel B. Effect of ischemic preconditioning on reactive oxygen species-mediated ischemia--reperfusion injury in the isolated perfused rat lung. *Clin Biochem* 2005 Jul;38(7):681-4.
- (82) Eppinger MJ, Jones ML, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. *J Surg Res* 1995 Jun;58(6):713-8.
- (83) Van Raemdonck DE, Jannis NC, De Leyn PR, Flameng WJ, Lerut TE. Warm ischemic tolerance in collapsed pulmonary grafts is limited to 1 hour. *Ann Surg* 1998 Dec;228(6):788-96.
- (84) Yamazaki F, Wada H, Aoki M, Inui K, Hitomi S. An evaluation of the tolerance of the autotransplanted canine lung against warm ischemia. *Jpn J Surg* 1989 May;19(3):326-33.

- (85) Lausberg HF, Graeter TP, Wendler O, Demertzis S, Ukena D, Schafers HJ. Bronchial and bronchovascular sleeve resection for treatment of central lung tumors. *Ann Thorac Surg* 2000 Aug;70(2):367-71.
- (86) Chen QK, Jiang GN, Ding JA, Gao W, Chen C, Zhou X. First successful bilateral living-donor lobar lung transplantation in China. *Chin Med J (Engl)* 2010 Jun;123(11):1477-8.
- (87) Chen F, Oga T, Sakai H, Matsumoto I, Yamada T, Sato M, et al. A prospective study analyzing one-year multidimensional outcomes in living lung transplant donors. *Am J Transplant* 2013 Nov;13(11):3003-9.
- (88) Mohite PN, Popov AF, Yacoub MH, Simon AR. Live related donor lobar lung transplantation recipients surviving well over a decade: still an option in times of advanced donor management. *J Cardiothorac Surg* 2013;8:37.
- (89) Tang YJ, Wang CY, Dong YZ, Wang CD. Lung autotransplantation for treating bronchus neoplasms. *Chin Med J (Engl)* 2007 Dec 20;120(24):2325-6.
- (90) Nagao RK, Cataneo AJ. [Autologous lobar lung implant after pneumonectomy: experimental model in dogs]. *Acta Cir Bras* 2005 Jul;20(4):311-6.
- (91) Cataneo AJ, Cataneo DC. Compensatory lung growth in autologous lobar implant: experimental study in dogs. *Transplant Proc* 2006 Apr;38(3):958-62.
- (92) Matsumoto I, Oda M, Tsunozuka Y, Tamura M, Kawakami K, Watanabe G. Experimental study of extracorporeal lung resection in dogs: ex situ sleeve resection and autotransplantation of the pulmonary lobe after

- extended pneumonectomy for central lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004 May;127(5):1343-9.
- (93) HUGGINS CE. Reimplantation of lobes of the lung. An experimental technique. *Lancet* 1959 Dec 12;2(7111):1059-62.
- (94) McGahren ED, Teague WG, Flanagan TL, White BJ, Barone GW, Johnson AM, et al. Airway obstruction after autologous reimplantation of the porcine lobe. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989 Apr;97(4):587-92.
- (95) Featherstone RL, Chambers DJ, Kelly FJ. Ischemic preconditioning enhances recovery of isolated rat lungs after hypothermic preservation. *Ann Thorac Surg* 2000 Jan;69(1):237-42.
- (96) Friedrich I, Spillner J, Lu EX, Bartling B, Barnscheid M, Sablotzki A, et al. Ischemic pre-conditioning of 5 minutes but not of 10 minutes improves lung function after warm ischemia in a canine model. *J Heart Lung Transplant* 2001 Sep;20(9):985-95.
- (97) Yang Y, Chen SX, Zhang WX. [Effect of ischemic preconditioning on human lung cell apoptosis in vivo and the expression of regulating gene bcl-2]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2002 Feb 28;27(1):43-5.
- (98) Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982 Mar;78(3):206-9.
- (99) Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;1(2):581-5.

- (100) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.
- (101) Barr ML, Schenkel FA, Bowdish ME, Starnes VA. Living donor lobar lung transplantation: current status and future directions. *Transplant Proc* 2005 Nov;37(9):3983-6.
- (102) Chen F, Chin K, Sato M, Aoyama A, Murase K, Azuma M, et al. Postoperative respiratory management in living donor lobar lung transplantation. *Clin Transplant* 2013 Jul;27(4):E383-E390.
- (103) Date H, Aoe M, Sano Y, Nagahiro I, Miyaji K, Goto K, et al. Improved survival after living-donor lobar lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004 Dec;128(6):933-40.
- (104) Deng C, Wu D, Zhai Z, Lin Q, Zhong Z, Yang Y, et al. Close concordance between pulmonary angiography and pathology in a canine model with chronic pulmonary thromboembolism and pathological mechanisms after lung ischemia reperfusion injury. *J Thromb Thrombolysis* 2015 Aug 19.
- (105) Fiorentino F, Angelini GD, Suleiman MS, Rahman A, Anderson J, Bryan AJ, et al. Investigating the effect of remote ischaemic preconditioning on biomarkers of stress and injury-related signalling in patients having isolated coronary artery bypass grafting or aortic valve replacement using cardiopulmonary bypass: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015;16:181.
- (106) Foster GP, Giri PC, Rogers DM, Larson SR, Anholm JD. Ischemic preconditioning improves oxygen saturation and attenuates hypoxic

- pulmonary vasoconstriction at high altitude. *High Alt Med Biol* 2014 Jun;15(2):155-61.
- (107) Zhou W, Zeng D, Chen R, Liu J, Yang G, Liu P, et al. Limb ischemic preconditioning reduces heart and lung injury after an open heart operation in infants. *Pediatr Cardiol* 2010 Jan;31(1):22-9.
- (108) Ogletree ML. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A2. *Fed Proc* 1987 Jan;46(1):133-8.
- (109) Date H. [Experimental studies on reimplantation response after lung transplantation]. *Nihon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1989 Mar;37(3):510-21.
- (110) Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999 Feb;49(2):91-102.
- (111) McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985 Jan 17;312(3):159-63.
- (112) Yildiz G, Demiryurek AT, Gumusel B, Lippton H. Ischemic preconditioning modulates ischemia-reperfusion injury in the rat lung: role of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol* 2007 Feb 5;556(1-3):144-50.
- (113) Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001 Jun;94(6):1133-8.
- (114) ISAACS A, LINDENMANN J, VALENTINE RC. Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957 Sep 12;147(927):268-73.
- (115) ISAACS A, LINDENMANN J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957 Sep 12;147(927):258-67.

- (116) Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 2014 Nov;1843(11):2563-82.
- (117) Krishnadasan B, Naidu B, Rosengart M, Farr AL, Barnes A, Verrier ED, et al. Decreased lung ischemia-reperfusion injury in rats after preoperative administration of cyclosporine and tacrolimus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002 Apr;123(4):756-67.
- (118) de PM, Fischer S, Liu M, Imai Y, Martins S, Sakiyama S, et al. Impact of human interleukin-10 on vector-induced inflammation and early graft function in rat lung transplantation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003 May;28(5):616-25.
- (119) Zhang T, Zhang F, Zhou YA, Wang YJ, Li XF, Chen DF. [Effect of ischemic preconditioning on cytokines during lung ischemia-reperfusion injury]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2003 Jul;41(7):545-7.
- (120) Zhao M, Fernandez LG, Doctor A, Sharma AK, Zarbock A, Tribble CG, et al. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 Nov;291(5):L1018-L1026.
- (121) Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, et al. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990 Apr 15;144(8):3034-8.
- (122) Ehling J, Tacke F. Role of chemokine pathways in hepatobiliary cancer. *Cancer Lett* 2015 Jun 26.

- (123) Fernandes JV, Cobucci RN, Jatoba CA, Fernandes TA, de Azevedo JW, de Araujo JM. The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathol Oncol Res* 2015 Jul;21(3):527-34.
- (124) Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008 Feb;117(2):244-79.
- (125) Tincani A, Andreoli L, Bazzani C, Bosiso D, Sozzani S. Inflammatory molecules: a target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2007 Nov;7(1):1-7.
- (126) Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 2014 Nov;1843(11):2563-82.
- (127) Roy I, Evans DB, Dwinell MB. Chemokines and chemokine receptors: update on utility and challenges for the clinician. *Surgery* 2014 Jun;155(6):961-73.
- (128) Garin A, Proudfoot AE. Chemokines as targets for therapy. *Exp Cell Res* 2011 Mar 10;317(5):602-12.
- (129) Allegretti M, Cesta MC, Garin A, Proudfoot AE. Current status of chemokine receptor inhibitors in development. *Immunol Lett* 2012 Jul 30;145(1-2):68-78.
- (130) Krishnadasan B, Farivar AS, Naidu BV, Woolley SM, Byrne K, Fraga CH, et al. Beta-chemokine function in experimental lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2004 Mar;77(3):1056-62.
- (131) Huerta L, Rancan L, Simon C, Isea J, Vidaurre E, Vara E, et al. Ischaemic preconditioning prevents the liver inflammatory response to lung

- ischaemia/reperfusion in a swine lung autotransplant model. *Eur J Cardiothorac Surg* 2013 Jun;43(6):1194-201.
- (132) Ishiyama T, Dharmarajan S, Hayama M, Moriya H, Grapperhaus K, Patterson GA. Inhibition of nuclear factor kappaB by IkappaB superrepressor gene transfer ameliorates ischemia-reperfusion injury after experimental lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005 Jul;130(1):194-201.
- (133) Sehnert B, Burkhardt H, Wessels JT, Schroder A, May MJ, Vestweber D, et al. NF-kappaB inhibitor targeted to activated endothelium demonstrates a critical role of endothelial NF-kappaB in immune-mediated diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 Oct 8;110(41):16556-61.
- (134) Li L, Wei C, Kim IK, Janssen-Heininger Y, Gupta S. Inhibition of nuclear factor-kappaB in the lungs prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice. *Hypertension* 2014 Jun;63(6):1260-9.
- (135) Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med* 2003 May;9(5):575-81.
- (136) Ross SD, Kron IL, Gangemi JJ, Shockey KS, Stoler M, Kern JA, et al. Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 Sep;279(3):L528-L536.
- (137) Naidu BV, Woolley SM, Farivar AS, Thomas R, Fraga C, Mulligan MS. Simvastatin ameliorates injury in an experimental model of lung ischemia-reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003 Aug;126(2):482-9.

- (138) Funaki H, Shimizu K, Harada S, Tsuyama H, Fushida S, Tani T, et al. Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation* 2002 Aug 27;74(4):551-6.
- (139) Goto M, Katayama KI, Shirakawa F, Tanaka I. Involvement of NF-kappaB p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1beta gene at two subregions of the upstream enhancer element. *Cytokine* 1999 Jan;11(1):16-28.

8. ANEXO

Modulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by ischaemic preconditioning in a lung autotransplant model[†]

Carlos Simón^{a,*}, Elena Vara^b, Ignacio Garutti^c, Guillermo González-Casaurrán^a, Leire Azcárate^a, Jesús Isea^a,
Luis Huerta^a and Federico González-Aragoneses^a

^a Department of Thoracic Surgery, Gregorio Marañón University General Hospital, Madrid, Spain

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology III, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

^c Department of Anesthesiology, Gregorio Marañón University General Hospital, Madrid, Spain

* Corresponding author. Department of Thoracic Surgery, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, 28007 Madrid, Spain. Tel: +34-915868391; fax: +34-915868391; e-mail: carlosmsa@telefonica.net (C. Simón).

Received 25 May 2011; received in revised form 5 September 2011; accepted 13 September 2011

Abstract

OBJECTIVES: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is believed to play a crucial role in lung ischaemia-reperfusion injury (LRI). Ischaemic preconditioning (IP) has been shown to protect several organs from ischaemia-reperfusion (IR) injury, although less is known about IP's effect on MCP-1 modulation. The objective of this study was to investigate IP's effect on MCP-1 expression in lung tissue and its relationship with oxidative stress and proinflammatory cytokine production in an experimental LRI model.

METHODS: Two groups (IP and control groups) of seven large white pigs underwent a lung autotransplant (left pneumonectomy, *ex situ* superior lobectomy and lower lobe reimplantation). Before pneumonectomy was performed in the study group, IP was induced with two cycles of 5 min of left pulmonary artery occlusion with a 5 min interval of reperfusion between the two occlusions. Blood samples and lung biopsies were obtained at prepneumonectomy (PPn), at prereperfusion (PRp) and up to 30 min after reperfusion of the implanted lobe (Rp-10' and Rp-30'). Haemodynamic and blood-gas measurements, evaluation of oxidative stress in lung tissue and MCP-1, tumour necrosis factor- α (TNF- α) and IL-1 protein and mRNA measurements in lung tissue were performed. Nonparametric tests were used to compare differences between groups. Data are expressed as mean \pm SEM.

RESULTS: In control lungs, MCP-1 protein levels were found to be higher at PRp, Rp-10' and Rp-30' than at PPn (0.59 ± 0.1 vs. 0.21 ± 0.05 , 0.47 ± 0.01 vs. 0.21 ± 0.05 and 0.56 ± 0.01 vs. 0.21 ± 0.05 , respectively; $P < 0.05$). These differences were not evident in the IP group. MCP-1 levels at PRp, Rp-10' and Rp-30' were significantly higher in the control group than in the IP group (0.59 ± 0.1 vs. 0.15 ± 0.02 , 0.47 ± 0.01 vs. 0.13 ± 0.01 and 0.56 ± 0.01 vs. 0.27 ± 0.01 , respectively; $P < 0.05$). MCP-1, TNF- α and IL-1 mRNA expressions were lower at PRp, Rp-10' and Rp-30' (control vs. IP group, $P < 0.05$) when IP was carried out. Lipid peroxidation metabolites and myeloperoxidase activity increase in lung tissue were prevented by IP.

CONCLUSIONS: In this model, LRI induced the expression of MCP-1 and the proinflammatory proteins TNF- α and IL-1 in control lungs. IP significantly reduced the expression of these chemokines and cytokines. These features may explain the reduction of oxidative stress observed with IP.

Keywords: Reperfusion injury • Ischaemic preconditioning • Monocyte chemoattractant protein-1 • Experimental animal models

INTRODUCTION

Currently, thoracic surgeons perform more and more complex procedures, which often involves inducing lung ischaemia for a given period of time. Lung ischaemia and the ensuing reperfusion precipitate lung tissue injury, which features alveolar damage, lung oedema and hypoxaemia. Different prophylactic and therapeutic measures have been investigated to prevent lung ischaemia-reperfusion injury (LRI). Ischaemic preconditioning (IP), defined as short periods of ischaemia prior to prolonged

ischaemia, has been shown to protect several organs from IR injury; these organs include the heart, liver, brain and kidneys, but the role of IP in LRI is not fully understood [1–3].

Previous studies have shown that alveolar macrophages contribute to the acute phase of LRI [4–6]. In response to oxidative stress, activated alveolar macrophages produce various cytokines and chemokines [7, 8]. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), a chemokine that regulates migration and activation of monocytes and macrophages, is believed to play a crucial role in this process, and its expression has been positively correlated with LRI in an isolated mouse lung model [4]. It is also known that the expression of MCP-1 in several epithelial cells is upregulated through tumour necrosis factor- α (TNF- α) and

[†]Presented at the 18th European Conference on General Thoracic Surgery, Valladolid, Spain, 30 May–2 June 2010.